

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Tageszeitliche Unterschiede in der Wirkung von
Actinomycin D und Cycloheximid auf die Bildung
von Cytochrom P-448 und Cytochrom P-450
in der Rattenleberzelle**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
WINFRIED BEIL
aus Mainz

Mainz 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552618_0003

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Tageszeitliche Unterschiede in der Wirkung von
Actinomycin D und Cycloheximid auf die Bildung
von Cytochrom P-448 und Cytochrom P-450
in der Rattenleberzelle**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
WINFRIED BEIL
aus Mainz

Mainz 1979



Dekan: Professor Dr. H. Leithoff

1. Gutachter: Professor Dr. G.F. Kahl

2. Gutachter: Professor Dr. E. Jähnchen

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 1979

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AD	- Aktinomycin D
AHH	- Arylhydrocarbonhydroxylase
CO	- Kohlenmonoxid
CH	- Cycloheximid
KG	- Körpergewicht
K_S	- Substratkonstante
MC	- 3-Methylcholanthren
MP	- Metyrapon
MG	- Molekulargewicht
NADP	- Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
PB	- Phenobarbital
SDS	- Sodiumdodecylsulfat (Laurylsulfat)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	1
ZIEL DER ARBEIT	13
METHODEN	14
I. Vorbehandlung der Versuchstiere und Aufbereitung der Mikrosomenfraktion	14
1. Vorbehandlung der Tiere	14
2. Mikrosomenpräparation	14
3. Eiweißbestimmung	16
II. Spektralanalytische Messungen	17
1. Bestimmung der Cytochrome P-450 und b_5	17
2. Ermittlung der apparenten Bindungskonstante K_S für Metyrapon in reduzierten Mikrosomen	17
III. Enzymatische Reaktionen	18
1. Die Biphenyl-Hydroxylierung	18
2. N-Demethylierung von Äthylmorphin	20
IV. Gelelektrophorese	21
V. Substanzen	22
VI. Statistik	23
ERGEBNISSE	24
I. Entwicklung des Gesamtkörpergewichtes und des Leberfeuchtgewichtes	24
II. Toxizität und Letalität	26
III. Einfluß des Behandlungsbeginnes auf die Bildung von Cytochrom P-448 durch 3-Methylcholanthren in Gegenwart von Cycloheximid und Actinomycin D	27
1. Spektroskopische Untersuchungen	27
2. Enzymatische Untersuchungen	29
3. Densitometrische Gelauswertung	31
4. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Beeinflussung der Induktion mit 3-Methylcholanthren	32

IV. Einfluß des Behandlungsbeginnes auf die Induktion von Cytochrom P-450 durch Phenobarbital in Gegenwart von Cycloheximid und Actinomycin D	33
1. Spektroskopische Untersuchungen	33
2. Enzymatische Untersuchungen	35
3. Densitometrische Gelauswertung	36
4. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Beeinflussung der Induktion mit Phenobarbital	36
DISKUSSION	38
ZUSAMMENFASSUNG	51
LITERATURVERZEICHNIS	54
Lebenslauf	

EINLEITUNG

Die Biotransformation von Fremdstoffen wie Pharmaka, Kanzerogenen und Insektiziden sowie von körpereigenen Stoffen wie Fettsäuren und Steroiden erfolgt im Organismus vorwiegend in der Leber. Unabhängig von einer Beurteilung dieser Reaktionen als Giftung oder Entgiftung ist die Folge der Umwandlungen eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit und damit der renal Ausscheidungsfähigkeit dieser vorwiegend lipophilen Substanzen.

Das Zellkompartiment, in dem nicht-synthetische, aber auch einige konjugierende Metabolisierungsschritte zu lokalisieren sind, ist das glatte endoplasmatische Retikulum der Leberzelle. Präparatorisches Korrelat des endoplasmatischen Retikulums ist die durch Ultrazentrifugation homogenisierter Leberzellen gewonnene Mikrosomenfraktion. Mikrosomen zeigen in vitro verschiedene Reaktionen. Beispielhaft seien erwähnt:

- die Oxydation von Alkylketten, z.B. die Seitenkettenoxydation von Hexobarbital und Thiopental (BRODIE et al., 1958);
- die Ringhydroxylierung, z.B. die p-Hydroxylierung von Acetanilid (BRODIE und AXELROD, 1948);
- die oxydative Desalkylierung, z.B. die Umsetzung von Codein zu Morphin (AXELROD, J., 1955);
- die ω -Hydroxylierung von Fettsäuren (LU und COON, 1968);
- die Testosteronhydroxylierung (CONNEY et al., 1968);

Das mikrosomale Enzymsystem benötigt NADPH und Sauerstoff (GILLETTE et al., 1957). Schlüsselenzym des mikrosomalen Enzymkomplexes ist das Cytochrom P-450, das 1958 als CO-bindendes Pigment von KLINGENBERG und GARFINKEL entdeckt und 1964 von OMURA und SATO als Cytochrom vom b-Typ beschrieben wurde. Seinen Namen erhielt Cytochrom P-450 dadurch, daß es

in reduzierter Form Kohlenmonoxid bindet, wobei das Absorptionsmaximum des CO-Cytochrom P-450 Komplexes bei 450 nm liegt (Omura und SATO, 1962). Außer Cytochrom P-450 enthält die Mikrosomenfraktion das Cytochrom b_5 als weiteres Hämoprotein (STRITTMATTER und BALL, 1954) sowie die Cytochrom b_5 -Reduktase (STRITTMATTER, 1958), die Cytochrom c-Reduktase (WILLIAMS und KAMIN, 1962) und die Glucuronyl-Transferase (BEAUFAY et al., 1974). Diese Enzymaktivitäten konnten gereinigt und, aus der Mikrosomenfraktion herausgelöst, einzeln dargestellt werden (LU und COON, 1968; LU et al., 1969, 1971, 1972; BEAUFAY et al., 1974).

1954 fanden BROWN et al., daß die in vivo-Gabe von Fremdstoffen die mikrosomalen Enzymaktivitäten erhöht. Inzwischen sind zahllose chemisch völlig verschiedenartige Substanzen bekannt, die die Aktivität des mikrosomalen Enzymsystems steigern (CONNEY, 1967), wobei sie vorwiegend eine Zunahme von Cytochrom P-450 bewirken (REMMER et al., 1968), während die Konzentration von Cytochrom b_5 und der Cytochrom b_5 -Reduktase nicht oder nur geringfügig beeinflußt wird. Letztlich sind die verschiedensten induktiv wirkenden Substanzen in zwei Gruppen aufzugliedern, deren Hauptvertreter Phenobarbital (REMMER, 1959) und 3-Methylcholanthren (CONNEY et al., 1956) sind. Die Steigerung des Gehaltes an Cytochrom P-450 nach MC- oder PB-Vorbehandlung ist mit einer induktorspezifischen Aktivitätssteigerung verschiedener oxidativer Enzymaktivitäten verbunden. PB stimuliert hierbei eine sehr breite Skala verschiedenster Reaktionen, u.a. die Desalkylierung von Amidopyrin, die Hydroxylierung von Hexo- und Pentobarbital (CONNEY et al., 1960, 1961), die Sulfoxydation von Chlorpromazin (RUBIN et al., 1964) und die N-Demethylierung von Äthylmorphin (SLADEK und MANNERING, 1969). MC dagegen aktiviert nur eine begrenzte Gruppe von Reaktionen, so die Hydroxylierung von Acetanilid

(CONNEY et al., 1959), die Hydroxylierung von Anilin (KAMPFFMEYER und KIESE, 1963) und die Arylhydrocarbonhydroxylierung (CONNEY et al., 1956). Weiterhin zeigen sich nach MC-Induktion gegenüber PB-Vorbehandlung folgende Unterschiede: Das Absorptionsmaximum des reduzierten CO-Cytochrom P-450-Komplexes wird von 450 auf 448 nm verschoben (SLADEK und MANNERING, 1966). ALVARES et al. (1967) postulierten daraufhin die Bildung eines neuen Cytochromes nach MC-Induktion und bezeichneten es als Cytochrom P-448. Diese Verschiebung um 2 nm im Differenzspektrum ist nicht an die Gegenwart des Induktors während des Messvorganges gebunden (JEFCOATE und GAYLOR, 1969; NEBERT, 1969) und kann durch in vitro-Inkubation mit MC nicht herbeigeführt werden (ALVARES et al., 1971).

Beim Aufzeichnen eines Differenzspektrums von reduziertem Cytochrom P-450 mit Äthylisocyanid (EtNC) zeigen sich zwei Absorptionsmaxima bei 430 und 455 nm. MC-Induktion verändert das Verhältnis der beiden Absorptionsmaxima zugunsten des langwelligen Gipfels, der sich dabei von 455 auf 453 nm verschiebt (ALVARES et al., 1967).

Die Zugabe von oxidierbaren Substanzen zu mikrosomalem Protein verändert das Differenzspektrum in charakteristischer Weise. Je nach Lage der Absorptionsmaxima und -minima lassen sich zwei Substantypen unterscheiden (REMMER et al., 1966; SCHENKMAN et al., 1967). Ein Typ I-Spektrum wird durch Hexobarbital (Absorptionsmaximum: 390 nm, Absorptionsminimum: 420 nm), ein Typ II-Spektrum durch Anilin (Absorptionsmaximum: 430 nm, Absorptionsminimum: 390 nm) hervorgerufen. PB- und MC-Induktion bewirken beide eine Zunahme der Extinktion bei Typ II-Spektren, während nach PB lediglich das Typ I-Spektrum in dieser Weise beeinflusst wird. MC dagegen führt bei Typ I-Spektren zu einer Abnahme der maximalen Extinktion.

Zur induktorspezifischen Differenzierung der Cytochrome P-450 kommt bei den enzymatischen Reaktionen dem oxidativen Stoffwechsel von Benzpyren und Biphenyl eine vorrangige Stellung zu.

1956 beschrieben CONNEY et al. die Hydroxylierung von Benzpyren durch Lebermikrosomen. Die Benzpyrenhydroxylase oder "Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase" (AHH) ist durch MC weitaus stärker induzierbar als durch PB (ALVARES et al., 1968). Die AHH läßt sich durch das Substrat selber induzieren, wie z.B. in Zellkulturen gezeigt wurde (NEBERT und GELBOIN, 1968). Der Umsatz von Benzpyren durch die AHH führt zu Metaboliten, die kovalent an die DNA gebunden werden (GELBOIN, 1969). An gereinigtem mikrosomalen Protein konnte LU et al. (1971) zeigen, daß die AHH-Aktivität an P-448 gebunden ist. Cytochrom P-450 entwickelt dagegen nur 10% der AHH-Aktivität von gereinigtem Cytochrom P-448 (LU et al., 1972). An genetisch unterschiedlichen Inzuchtmäusstämmen konnte man nachweisen, daß Cytochrom P-448 und die AHH an einen Genloкус gebunden sind (GIELEN et al., 1972; NEBERT et al., 1973).

Die ersten in vitro-Versuche zur Untersuchung der mikrosomalen Hydroxylierung mit Biphenyl als Substrat beschrieben MITOMA et al. (1956). Sie konnten dabei zwei Hydroxylierungsprodukte nachweisen: 2-OH Biphenyl und 4-OH Biphenyl. CREAVEN et al. (1965) postulierten die Existenz zweier verschiedener Enzyme für beide Reaktionen und zeigten, daß die Aktivitäten und das Verhältnis der 2- und 4-Hydroxylierung Spezies- und altersabhängig ist. In allen von ihnen untersuchten Tierarten ist 4-OH Biphenyl der Hauptmetabolit, während nur wenige Spezies (Maus, Katze, Hamster) zusätzlich die Biphenyl-2-Hydroxylierung besitzen. Sie ist bei jungen Ratten zu finden, nicht aber sehr stark bei erwachsenen Tieren (CREAVEN et al., 1965). BASU et al. (1971) fanden, daß in Rattenlebermikrosomen

die Aktivität der 2- und 4-Hydroxylase bis zum 20. Tag nach der Geburt stark ansteigt. Ab dem 30. Lebenstag liegt die Aktivität der 4-Hydroxylase konstant bei 50% der Maximalaktivität am 20. Tag, während die 2-Hydroxylase kontinuierlich absinkt und ab dem 60. Tag praktisch nicht mehr nachweisbar ist. Als weitere Metaboliten, neben 2-OH- und 4-OH Biphenyl, wurden 2,2' Dihydroxybiphenyl und 4,4' Dihydroxybiphenyl (BURKE und BRIDGES, 1975; WIEBKIN et al., 1976), sowie 3-OH Biphenyl (RAIG et al., 1976) gefunden. Das Verhältnis von 2-OH zu 3-OH Biphenyl beträgt 2 : 1 in Hamster- und Kaninchenmikrosomen, 1 : 1 in Mäusemikrosomen (BILLINGS und McMAHON, 1978). Die Vorbehandlung mit PB stimuliert selektiv die 4-Hydroxylase, während polyzyklische Kohlenwasserstoffe (Benzpyren) vorwiegend die 2-Hydroxylase und in geringerem Ausmaß auch die 4-Hydroxylase steigern (CREAVEN und PARKE, 1966). Die 3-Hydroxylase ist durch PB induzierbar, nicht jedoch durch MC (BILLINGS und McMAHON, 1978). Nach in vitro-Inkubation von mikrosomalem Protein mit MC steigt die Aktivität der 2-Hydroxylase stark an, während PB die 4-Hydroxylase in vitro nicht verändert (McPHERSON et al., 1976). Untersuchungen des Zeitverlaufes der Aktivitätssteigerung der 2-Hydroxylase nach in vivo-Gabe von Benzpyren zeigen einen zweiphasischen Verlauf. Nach einem initialen starken Aktivitätsanstieg sinkt 8 Stunden nach Induktionsbeginn die 2-Hydroxylase wieder auf Kontrollwerte ab, gefolgt von einem allmählichen Wiederanstieg (McPHERSON et al., 1976). Bei der 4-Hydroxylase ist dieser zweiphasische Verlauf nach PB nicht festzustellen, sondern man findet eine kontinuierliche Aktivitätszunahme. Aus diesen Untersuchungsergebnissen zogen McPHERSON et al. den Schluß, daß die Biphenyl-2-Hydroxylase in einer aktiven und einer inaktiven Form vorliegt. Die Aktivität der 2-Hydroxylase und der 4-Hydroxylase in Kontroll- und PB-behandelten

Tieren ist Cytochrom P-450-abhängig, während MC die inaktive 2-Hydroxylase, unabhängig vom Gehalt an Cytochrom P-448, in eine aktive Form überführen kann.

Eine weitere induktorspezifische Unterscheidungsmöglichkeit bietet das Verhalten der AHH und der Biphenyl-Hydroxylase gegenüber Enzymhemmstoffen. SKF 525-A (2-Diäthyl-2,2-Diphenylvalerat) hemmt die Aktivität der AHH von Kontroll- und PB-induzierten Mikrosomen, nicht aber die AHH nach MC-Induktion (CONNEY et al., 1957; LU und WEST, 1972). Bei der Biphenyl-Hydroxylase wird die 4-Hydroxylierung nach PB-Induktion durch SKF 525-A stark gehemmt, während dies für die 2-Hydroxylierung nach MC-Induktion nicht der Fall ist (BURKE und BRIDGES, 1975). Die Hemmung von Cytochrom P-450-abhängigen Reaktionen durch SKF 525-A findet man auch bei der Äthylmorphin N-Demethylase und der 3-Methyl-4-Methylaminoazobenzol-Demethylase (3-MMAB), einem Enzym, das sowohl durch MC als auch - gleichermaßen gut - durch PB induzierbar ist (SLADEK und MANNERING, 1969a).

Alpha-Naphthoflavon (ANF) zeigt einen gegensätzlichen Effekt zu SKF 525-A, nämlich eine vorwiegende Hemmung der Cytochrom P-448-abhängigen Reaktion. ANF hemmt sowohl die Aktivität der AHH (DIAMOND und GELBOIN, 1969) als auch die Biphenyl-Hydroxylierung, besonders die 2-Hydroxylierung (KAHL et al., 1977) in MC-induzierten Mikrosomen, während nach PB-Vorbehandlung ein ausgeprägter Hemmeffekt die Biphenyl-Hydroxylase nicht vorhanden ist (GALINSKY, 1976). Metyrapon (2-Methyl-1,2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon) ist ein Hemmstoff der 11 β - und 18-Hydroxylase von Steroiden (LIDDLE et al., 1958; KRAULIS und BIRMINGHAM, 1963). Im mikrosomalen Enzymsystem bewirkt MP eine Hemmung von Cytochrom P-450 abhängigen Reaktionen, so der Hexobarbitaloxydase und der Amidopyrindemethylase

(LEIBMAN, 1969). Die AHH-Aktivität, die nach PB-Induktion vorliegt, ist durch MP hemmbar, nicht jedoch die nach MC-Vorbehandlung vorliegende (GOUJON et al., 1972). Die MP-Zugabe zu PB-induzierten Mikrosomen bewirkt eine starke Hemmung der Biphenyl-Hydroxylase, während nach MC-Vorbehandlung der inhibitorische Effekt schwächer ist (GALINSKY, 1976; KAHL, G.F. et al., 1977). BURKE und BRIDGES (1975) fanden durch MP eine selektive Blockierung der 4-Hydroxylierung in Kontrollmikrosomen. Auch spektroskopisch differenziert MP zwischen Cytochrom P-450 und P-448. Reduziertes Cytochrom P-450 bildet mit MP ein Differenzspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 446 nm (HILDEBRANDT et al., 1969). PB-Behandlung führt zu einer Erhöhung der Affinität von MP zu Cytochrom P-450, während nach MC die Bindung von MP an Cytochrom P-448 erheblich gesenkt ist (JONEN et al., 1974; KAHL, R. et al., 1974). Dabei wird das Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom P-450-MP-Komplexes nach MC-Vorbehandlung von 446 nm auf 443 nm verschoben, während nach PB keine solche Verschiebung erfolgt.

Durch Auftrennung der beiden Cytochrome in der Laurylsulfat (Natriumdodecylsulfat = SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese konnte man die Ausbildung eines unterschiedlichen Musters im Hämoproteinbereich nach MC- und PB-Vorbehandlung beobachten und dadurch die unterschiedlichen Induktionsvorgänge genauer charakterisieren. Das Molekulargewicht von Kaninchen-Cytochrom-P-450 beträgt, mittels Gelfiltration bestimmt, 280 000 Dalton (AUTOR et al., 1973; v.d.HOEVEN und COON, 1974). Durch die SDS-Gelelektrophorese wird dieser Komplex in Untereinheiten zerlegt (WELTON und AUST, 1974a); man findet hier ein Molekulargewicht von 40 000 bis 60 000 Dalton. Insgesamt zeigen sich bis zu 6 (Nomenklatur beim Kaninchen: P-450LM₁₋₆ = Cytochrom P-450, Lebermikrosomen, Bande 1-6) Hämoproteinbanden. Nach PB-Induktion findet man eine Zunahme der

Banden mit etwas leichterem Molekulargewicht zwischen 44 000 Dalton (ALVARES und SIEKEVITZ, 1973; WELTON und AUST, 1974), und 50 000 Dalton HAUGEN et al., 1975; RYAN et al., 1975), während nach MC-Induktion Banden mit höherem Molekulargewicht zwischen 53 000 Dalton (RYAN et al., 1975) und 58 000 Dalton (DICKINS et al., 1978) dominieren.

Nach MC-Vorbehandlung differiert das Hämoproteinmuster innerhalb verschiedener Spezies sowie zwischen verschiedenen Organen einer Spezies. KAWALEK et al. (1975) fanden in gereinigtem Kaninchen-Cytochrom P-448 eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 51 000 Dalton. Bei Ratten liegt das Molekulargewicht des induzierten Bandes bei 53 000 Dalton (KAWALEK et al., 1975; RYAN et al., 1975). Ein Speziesunterschied findet sich auch im Hydroxylierungsvermögen für Benzpyren, wobei Ratten eine 20-fach größere AHH-Aktivität als Kaninchen-P-448 hat (KAWALEK und LU, 1975). Cytochrom P-448 von MC-responsiven Mäusen hat ein Hauptband mit einem Molekulargewicht von 55 000 Dalton und ein weiteres MC-induzierbares Band vom Molekulargewicht 57 000 Dalton (BOOBIS et al., 1977). Cytochrom P-448 aus Kaninchennierenmikrosomen hat ein Hämoproteinmuster mit einem Hauptband von 57 000 Dalton, während für Kaninchenleber-P-448 das Hauptband bei 53 000 Dalton liegt (ATLAS et al., 1977).

Diese Ergebnisse weisen auf eine Vielförmigkeit von Cytochrom P-448 hin. COMAI und GAYLOR (1973) sowie RYAN et al. (1975a) konnten nach Reinigung und nachfolgender säulenchromatographischer Trennung jeweils zwei Populationen von Cytochrom P-448 und P-450 darstellen, die sich in ihrem CO-, EtNC- und Absolutspektren voneinander unterscheiden. Immunologische Untersuchungen mit Verwendung von P-448- und P-450-IgG-Antikörpern im Ouchterlony-Test zeigen 4 unterschiedliche Präzipitationslinien von Cytochrom P-450, sowie 2 Linien von Cytochrom P-448 (THOMAS et al., 1976; 1976a).

Eine Zuordnung von Enzymreaktionen zu bestimmten P-450-Banden gelang beim Kaninchen durch vergleichende Betrachtung der lebenszeitlichen Veränderung von Enzymaktivitäten mit den gelelektrophoretischen Hämoproteinbanden. HAUGEN et al. (1975) fanden eine Beziehung der Äthylmorphindemethylase und Biphenyl-4-Hydroxylase zur Bande P-450LM₂ (MG = 50 000 Dalton). ATLAS et al. (1977) zeigten, daß nach MC-Induktion die N-Acetylarylamin-Hydroxylase parallel zu Cytochrom P-448LM₄ (MG = 54 000 Dalton) ansteigt, während die Aktivierung der AHH und der Biphenyl-2-Hydroxylase mit einer Zunahme des Bandes P-448LM₅ (MG = 57 000 Dalton) verknüpft ist. R. KAHL und WULFF (1978) fanden bei der Ratte eine Zuordnung der durch Äthoxyquin induzierbaren Epoxidhydratase zu einem Band mit dem Molekulargewicht 45 000 Dalton.

Schon kurz nachdem die differentielle Induktion mikrosomaler Enzymaktivitäten nach MC- bzw. PB-Vorbehandlung erkannt worden war, wurden Untersuchungen des Induktionsmechanismus angestellt. Enzymaktivitäten können prinzipiell durch folgende Eingriffsmöglichkeiten gesteigert werden:

1. durch eine global erhöhte Synthese von Enzymproteinen;
2. durch Neusynthese eines spezifischeren Enzymes;
3. durch direkte Aktivierung bereits vorhandenen Enzyms;
4. durch eine indirekte Aktivierung vorhandenen Enzyms, z.B. durch Neusynthese von aktivierenden Co-Faktoren;
5. durch einen verminderten Abbau von Enzym;

Da die induktive Wirkung von PB und MC durch die gleichzeitige Gabe von Proteinsyntheseinhibitoren wie Aktinomycin D (GELBOIN und BLACKBURN, 1964; ALVARES et al., 1968a), Puromycin (CONNEY und GILMAN, 1963), sowie Äthionin (CONNEY et al., 1960) blockierbar ist, hängt der Induktionseffekt bei beiden Substanzen mit einer Steigerung der de-novo-Protein-

synthese zusammen. PB und MC beeinflussen in unterschiedlicher Weise den RNA-Stoffwechsel als Vorstufe der Proteinsynthese sowie die Proteinsynthese in der Leberzelle selbst. Nach PB-Induktion findet man eine Zunahme des mikrosomalen Proteins pro Gramm Leber um 40% (REMMER und MERKER, 1963), während MC zwar den Gesamtproteingehalt, nicht aber die mikrosomale Proteinmenge der Leber erhöht (ARCOS et al., 1961). Der in vitro-Einbau von ^{14}C -Leucin in mikrosomales Protein ist nach MC um 25% gesteigert (KATO et al., 1965), nach PB aber um 160% (GELBOIN und SOKOLOFF, 1961). JONDORF et al. (1966) zeigten, daß der gesteigerte in vitro-Einbau von ^{14}C -Phenylalanin nach MC durch Adrenal- und Hypophysektomie blockierbar ist, während die gesteigerte Einbaurate nach PB-Induktion durch diesen Eingriff unbeeinflusst bleibt. Nach Inkubation von mikrosomalem Protein mit Polyuracil, einer synthetischen m-RNA, die den Einbau von Phenylalanin katalysiert, zeigt sich nach PB-Vorbehandlung eine doppelt so hohe Einbaurate von ^{14}C -Phenylalanin in mikrosomales Protein (KATO et al., 1966). KATO et al. folgerten aus ihren Untersuchungen, daß nach PB-Vorbehandlung eine Erhöhung der mikrosomalen Bindung für endogene m-RNA vorliegt. Bis zu 4 Tagen nach PB-Induktion ist der gesamte RNA-Gehalt (ARGYRIS, 1968), nicht aber der DNA-Gehalt der Leberzelle erhöht (WOLD und STEELE, 1972). Die differentielle Auftrennung der r-RNA zeigt, daß 16 Stunden nach PB-Injektion eine erhöhte Markierung der 18 S und 28 S r-RNA im Cytoplasma nach Belastung mit ^3H -Orotsäure vorliegt (COHEN und RUDDON, 1970; SMITH et al., 1972) und daß der Gehalt an 45 S präribosomaler RNA (SMITH et al., 1972) im Zellkern erhöht ist. Allerdings bleibt die Einbaurate von ^3H -Orotsäure sowie von ^{14}C -Adenin in die 45 S präribosomale RNA unverändert (SMITH et al., 1972). Der erhöhte Gehalt im Kern wird deshalb durch eine erhöhte intranukleäre Stabilität dieser RNA nach PB-Induktion erklärt (SMITH et al., 1974), herbeigeführt durch

eine erhöhte intranukleäre Methylierungsrate, während gleichzeitig die RNA-Polymerase und RNA-Ribonuklease unverändert bleiben (SMITH et al., 1976). Diese Stabilisierung führt zu einer vermehrten Ausschleusung von 45 S RNA aus dem Kern (HAZAN und McCAULY, 1976), die die gesteigerte Markierung von 18 S und 28 S cytoplasmatischer r-RNA bedingt. Die vermehrte Bereitstellung von 18 S und 28 S r-RNA erfolgt, bevor eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums zu beobachten ist (STAEBLI et al., 1969).

Nach MC-Vorbehandlung findet man in Vergleich mit PB folgende Veränderungen im RNA-Metabolismus der Leberzelle:

1. Die Basenzusammensetzung der r-RNA unterscheidet sich nach MC-Induktion von der nach PB-Vorbehandlung (BRESNICK und MOSSE, 1969; WOLD und STEELE, 1972).
2. Nach MC findet man, im Gegensatz zur PB-Wirkung, keinen erhöhten Einbau von ^3H -Orotsäure in die 18 S und 28 S cytoplasmatische RNA (BRESNICK et al., 1966; HOPKINSON und ARGYRIS, 1973).
3. In direkt vergleichenden Untersuchungen zeigten SMITH et al. (1977), daß nach MC, im Unterschied zu PB, keine Zunahme des Gehalts an 45 S RNA sowie keine erhöhte Stabilität dieser RNA im Kern zu finden ist.

Aus diesen Unterschieden zogen SMITH et al. (1977) den Schluß, daß Veränderungen im RNA-Metabolismus nicht verantwortlich sind für die Aktivierung des mikrosomalen Enzymsystems nach MC-Vorbehandlung. Zu dieser Aussage kontroverse Ergebnisse findet man allerdings in zahlreichen Arbeiten. So fanden andere Autoren nach MC-Vorbehandlung eine erhöhte RNA-Polymeraseaktivität (BRESNICK, 1966; YOUNGER et al., 1972) sowie einen erhöhten Spiegel von intranukleärer RNA (YOUNGER et al., 1972) und 18 S und 28 S cytoplasmatischer RNA (BRESNICK et al., 1968).

ARGYRIS und HEINEMANN (1975) konnten eine Erhöhung der freien r-RNA bis zu 12 Stunden sowie eine Steigerung der membrangebundenen r-RNA ab 72 Stunden nach MC-Induktion nachweisen. Einen 30-fach erhöhten Gehalt von poly-Adenin-reicher RNA fanden LANCLOS und BRESNICK (1976) nach MC, einer RNA-Form, die Bestandteil der m-RNA in der Eukaryontenzelle ist. Neuere Arbeiten zeigen, daß MC die Proteinsynthese auch auf der Stufe der Translation beeinflußt. Bei der Translation, dem letzten Schritt der Proteinsynthese, wird in der Startreaktion je ein Molekül N-Formyl-methionyl-t-RNA und ein Molekül m-RNA mit dem Basentriplett AUG (Adenin-Uracil-Guanin), das das Signal für den Peptidkettenanfang codiert, an eine 30 S r-RNA-Untereinheit angelagert und bildet den Initiator-komplex für alle nachfolgenden Reaktionen. Die Komplexbildung erfordert drei Proteinfaktoren (IF_1 , IF_2 , IF_3), Magnesium und Guanosintriphosphat (BRAWERMANN et al., 1969; HEYWOOD, 1970; MURTY et al., 1974). Nach MC-Vorbehandlung bewirkt der Proteinfaktor IF_2 eine um 50-75% gesteigerte Geschwindigkeit der durch endogene m-RNA gesteuerten Hämoglobinsynthese in Kaninchenretikulozyten (HOPKINSON et al., 1974; BRESNICK et al., 1975). CHAN et al. (1977) konnten zeigen, daß nach Dimethylbenzanthracen, einem anderen polycyclischen Kohlenwasserstoff, durch den Faktor IF_2 eine gesteigerte Bindung von 3H -Methionyl-t-RNA an endogene 30 r-RNA erfolgt. Zusammenfassend sind die Veränderungen des RNA-Metabolismus durch MC und PB folgendermaßen zu beschreiben. Nach PB-Induktion findet man eine Steigerung des Bestandes an nukleärer und ribosomaler RNA. MC bewirkt eine Aktivierung von Co-Faktoren der Translation, während über Veränderungen des RNA-Gehaltes widersprüchliche Ergebnisse vorliegen.

ZIEL DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß des Tagesrhythmus auf die Synthese von Cytochrom P-448 und P-450 nach 3-Methylcholanthren- und Phenobarbital-Gabe bei gleichzeitiger Anwendung von Inhibitoren der Proteinsynthese (Aktinomycin D und Cycloheximid) untersucht werden. Zur Charakterisierung der neugebildeten Cytochrome P-450 wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Lage des Absorptionsmaximums des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes.
2. Affinität für Metyrapon in reduzierten Mikrosomen durch Bestimmung der apparenten Bindungskonstanten K_S .
3. Aktivität der Biphenyl-Hydroxylase und der Äthylmorphin-N-Demethylase.
4. Auftrennung des mikrosomalen Proteins in der SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese.

Weiterhin sollte mit diesen Untersuchungen ein Beitrag zu der Frage geleistet werden, ob die Neusynthese von Cytochrom P-450 durch MC und PB auf der Stufe der Transkription oder der Translation reguliert wird.

METHODEN

I. Vorbehandlung der Versuchstiere und Aufbereitung der Mikrosomenfraktion

1. Vorbehandlung der Tiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten der Gewichtsklasse 150-180 g wurden in 12 Gruppen eingeteilt und nach dem in Tabelle 1 dargestellten Schema behandelt. Phenobarbital, gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung, wurde zur Stunde 0 und + 12 injiziert, 3-Methylcholanthren, suspendiert in Erdnußöl, zur Stunde 0. Aktinomycin D, gelöst in 10%igem Äthanol, wurde zur Stunde - 1, + 4 und + 12 gegeben, Cycloheximid, gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung, zur Stunde - 1, + 6, + 12 und + 18. Die Applikation erfolgte durch intra-peritoneale Injektion, die Konzentrationen waren so berechnet, daß 0,5 ml Injektionsvolumen pro 150 g Körpergewicht appliziert wurden.

Um die Abhängigkeit einer Hemmung der Phenobarbital- und 3-Methylcholanthren-Induktion durch Aktinomycin und Cycloheximid von der Tageszeit zu prüfen, wurde als Zeitpunkt des Versuchsbeginnes (in der Tabelle 1 = Std. 0) 20 Uhr abends und 10 Uhr morgens gewählt. Die Tiere wurden unter natürlichen Beleuchtungsverhältnissen gehalten, und ihnen stand bis zum Töten Altromin-Trockenfutter (Firma Altromin, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum zur Verfügung. Pro Gruppe wurden 3-5 Tiere eingesetzt.

2. Mikrosomenpräparation

Das Töten der Tiere erfolgte durch Dislokation der Halswirbelsäule und anschließendes Ausbluten durch Eröffnen der Halsgefäße. Anschließend wurden die Lebern durch einen in die Pfortader eingebundenen Katheter mit eiskalter

Tabelle 1: Schema der Vorbehandlung der Versuchstiere

Zeit	AD + PB	CH + PB	AD + MC	CH + MC	AD	CH
- 1 Std.	AD	CH	AD	CH	AD	CH
0 Std.	PB	PB	MC	MC	ØL	ØL
+ 4 Std.	AD	-	AD	-	AD	-
+ 6 Std.	-	CH	-	CH	-	CH
+ 12 Std.	AD + PB	CH + PB	AD	CH	AD	CH
+ 18 Std.	-	CH	-	CH	-	CH
+ 24 Std.	Tötung		Tötung		Tötung	

Tabelle 1 zeigt das Behandlungsschema der Versuchstiere.

2 weitere Gruppen erhielten nur den Induktor PB oder MC alleine, wobei PB zur Stunde 0 und + 12 appliziert wurde, MC zur Stunde 0.

Die Kontrollgruppen erhielten entweder zur Stunde 0 und + 12 0,9%ige NaCl-Lösung oder zur Stunde 0 Erdnußöl. Weiterhin wurde das in der entsprechenden Behandlungsgruppe applizierte Lösungsmittel für AD (10% Äthanol) bzw. CH (0,9% NaCl) entsprechend gegeben.

Dosierung: PB: 80 mg/kg; MC: 20 mg/kg; AD: 0,75 mg/kg; CH: 1 mg/kg.

Die Konzentrationen waren so berechnet, daß 0,5 ml Injektionsvolumen pro 150 g Tier appliziert wurde.

0,9%iger NaCl-Lösung perfundiert, bis sie bei gleichzeitiger Massage nach 2-3 Minuten blutleer waren. Die Lebern wurden herauspräpariert und in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gesammelt. Anschließend wurden die Lebern gewogen und mit dem 2-fachen ihres Feuchtgewichtes mit Saccharose-Versen-Tris (SVT)-Lösung versetzt (Saccharose 0,25 M, Titriplex III = Na-EDTA 0,005 M, Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan 0,02 M mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt). In einem Eisgefäß bei max. 4° C wurden die Lebern mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert und anschließend 15 Minuten lang bei 1600xg und weitere 30 Minuten bei 9000xg in einer Sorvall-Zentrifuge, Modell RC2-B, zentrifugiert, was zur Abtrennung von Kerntrümmern und Mitochondrien führte. Der Überstand wurde anschließend in einer Beckman-Ultrazentrifuge (Typ L2 65 B) bei 105000xg und 4° C 60 Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene mikrosomale Pellet wurde in 25 ml SVT-Lösung resuspendiert und nochmals in der oben beschriebenen Weise in der Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Zuletzt wurde das so gewaschene Sediment in 2-4 ml SVT-Lösung resuspendiert und bei - 20° C aufbewahrt.

3. Eiweißbestimmung

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951). Als Standard diente Lab-Trol^(R) (Dade Reagents Inc., USA) mit einem Proteingehalt von 75 mg/ml.

II. Spektralanalytische Messungen

Alle spektralanalytischen Bestimmungen wurden an einem Perkin-Elmer 356 Spektrophotometer durchgeführt.

1. Bestimmung der Cytochrome P-450 und b_5

Die Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehalts erfolgte nach der Methode von OMURA und SATO (1964a), die Bestimmung des Cytochrom b_5 -Gehalts nach der Methode von RAW und MAHLER (1959)

2. Ermittlung der apparenten Bindungskonstante K_s für Metyrapon in reduzierten Mikrosomen

In 6 ml Glycerin-Kaliumphosphat-Puffer (0,25 M K_2HPO_4 in 30% Glycerin, pH 7,8) wurden 6 mg Mikrosomenprotein eingebracht, durch Zugabe von 1 mg/ml $Na_2S_2O_4$ reduziert und je 2,5 ml in eine Probe- und Referenzküvette (Schichtdicke 1 cm) verteilt. Nach Erstellung der Basislinie wurde die apparente Bindungskonstante K_s für MP durch kumulative Zugabe von 0,01 bis 0,1 ml einer 0,25, 2,5 oder 25 mM MP-Lösung (in Glycerin-Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8) in die Probeküvette bestimmt. Im einzelnen wurden kumulativ 2 x 25 μM , 50 μM , 150 μM , 250 μM , 1500 μM und 2500 μM MP in 8 aufeinanderfolgenden Titrationsschritten bis zu einer Endkonzentration von insgesamt 5 mM MP in die Probeküvette eingebracht; bei Phenobarbital-induzierten Mikrosomen erfolgte die Titration mit jeweils 1/10 der MP-Konzentration, also bis zur Gesamtkonzentration von 0,5 mM MP. Die Volumenzunahme in der Probeküvette wurde durch gleichzeitige Zugabe der gleichen Menge Glycerin-Kaliumphosphatpuffer in die Referenzküvette ausgeglichen. Insgesamt wurden in beiden Küvetten bis zum Erreichen der jeweiligen Endkonzentration 0,29 ml Puffer eingebracht, d.h.

es erfolgte eine Gesamtverdünnung des mikrosomalen Proteins von 1 : 1,12. Die Untersuchung erfolgte bei einer Inkubationstemperatur von 30° C, die Zeit zwischen Zugabe der MP-Lösung und dem Aufzeichnen des Differenzspektrums betrug jeweils 3 Minuten, bei der höchsten MP-Konzentration wurde bei MC-induzierten Mikrosomen 5 Minuten gewartet. Zur Auswertung wurde die Absorptionsdifferenz zwischen Basislinie und dem Differenzspektrum am Absorptionsmaximum (443-446 nm) gegenüber 490 nm ermittelt. Zur Ermittlung der Bindungskonstanten wurden die reziproken Werte der Absorptionsdifferenzen und der MP-Konzentrationen in Lineweaver-Burk-Diagrammen aufgezeichnet, um aus dieser graphischen Darstellung die für die rechnerische Auswertung geeigneten Konzentrationsbereiche, in denen lineare Abhängigkeit bestand, festzulegen. Die K_S -Werte wurden dann endgültig durch Errechnen einer Regressionsgeraden an einem Wang "Serie 700 A" Rechner ermittelt.

III. Enzymatische Reaktionen

1. Die Biphenyl-Hydroxylierung

Die Biphenyl-Hydroxylierung wurde in Anlehnung an die von CREAVEN et al. (1965) beschriebene Methode durchgeführt. Sämtliche Ansätze erfolgten als Doppelbestimmungen. Im Eisbad stehende, dunkel getönte 25 ml Erlenmeyerkolben wurden mit folgenden Substanzen beschickt: 0,62 ml Aquabidest, 0,25 ml Tris-Puffer (0,2 Molar, pH 8,5), 0,03 ml $MgCl_2$ (0,1 Molar), 0,383 mg NADP (Endkonzentration: 0,36 mM), 1,025 mg Glucose-6-Phosphat (Endkonzentration: 3,37 mMolar) und 4,5 μ l Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (140 U/ml).

In die so beschickten Erlenmeyerkolben wurden jeweils 0,1 ml einer auf 10 mg/ml eingestellten Mikrosomensuspension gegeben, so daß sich in dem Endvolumen des Ansatzes eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml befand. Als Standards dienten Ansätze, in die Aliquote einer 45,2 mM 2-OH Biphenyl bzw. 4-OH Biphenyl-Lösung (Lösungsmittel: Methanol) eingegeben wurden, so daß die Endkonzentration von 2-OH Biphenyl bzw. 4-OH Biphenyl 43,5 μ M betrug. Nach einer 2-minütigen Präinkubation im Wasserbad (37° C) wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μ l einer 80 mM Biphenyl-Lösung (Lösungsmittel: Benzol:Methanol, 1 : 61,5) gestartet. Nach 10-minütiger Inkubation im Wasserbad (37° C) bei indirektem Licht wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 2N HCl-Lösung gestoppt. In die Leerwerte und Standards wurde jetzt das Mikrosomenprotein gegeben. Nach Hinzufügen von 4 ml Heptan zu jedem Ansatz wurden die Kolben mit Glaskugeln verschlossen und erneut 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Der Kolbeninhalt wurde anschließend in 13 ml-Schliffstopfen-Reagenzgläser überführt und 10 Minuten lang in einer "Heraeus-Christ-Zentrifuge JJ 11 KS" bei 3000 U/min zentrifugiert. Von der nun abgetrennten oberen (=Heptan-) Phase wurden 3 ml abpipettiert und mit 4 ml 0,1 N NaOH 60 Sekunden lang geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurde die obere (organische) Phase mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Von der unteren (NaOH) Phase wurden 2 ml abpipettiert und mit 0,5 ml 0,5 N Bernsteinsäure versetzt. Der pH-Wert dieser Lösung lag zwischen 5,5 - 5,7. Die anschließende Messung erfolgte an einem Spektralfluorometer Zeiss. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit dem Fluoreszenzstandard F53/10557 bei folgender Einstellung: Erregermonochromator: 395 nm, Spalt: 1,0 mm, Fluoreszenzmonochromator: 533 nm, Spalt: 0,05 mm. Die anschließende Probenmessung erfolgte nach folgendem Schema:

Für 2-OH Biphenyl: Erregermonochromator: 295 nm, Spalt: 1,0 mm,
Fluoreszenzmonochromator: 415 nm, Spalt: 1,0 mm; Für 4-OH Biphenyl:
Erregermonochromator: 275 nm, Spalt: 1,0 mm, Fluoreszenzmonochromator:
338 nm, Spalt: 1,0 mm.

Die Auswertung erfolgte nach Eichkurven unter Berücksichtigung des bei der Geräteeinstellung 295/415 nm miterfaßten Fluoreszenzanteils von 4-OH Biphenyl bei der Messung von 2-Hydroxybiphenyl.

2. N-Demethylierung von Äthylmorphin

Die Äthylmorphin-Demethylierung wurde in Anlehnung an die von NASH (1953) beschriebene Methode durchgeführt. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, für jede Probe wurde ein separater Leerwert mitgeführt.

Im Eisbad stehende 15 ml Schüttelbirnen wurden mit folgendem Inkubationsgemisch beschickt: 0,05 ml regenerierendes System mit 0,75 mg Glucose-6-Phosphat (Endkonzentration: 2,5 mM) und 5 µl Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (140 U/ml), 0,1 ml Mikrosomensuspension (1 mg Protein/0,1 ml entsprechend 1 mg/ml Protein im Reaktionsansatz), 0,1 ml Äthylmorphin (2,54 mg, Endkonzentration: 8,0 mM), 0,7 ml Soerensen-Phosphat-Puffer (0.067M pH 7,4), 0,05 ml NADP (0,39 mg, Endkonzentration: 0,5 mM). Die Leerwerte wurden entsprechend beschickt; anstatt des Substrates Äthylmorphin wurden 0,1 ml Soerensen-Phosphat-Puffer eingesetzt. Als Standards dienten 5 Ansätze, die neben dem in den Proben eingesetzten System aus Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, NADP und 0,1 ml einer gemischten Mikrosomensuspension das nachzuweisende Reaktionsprodukt Formaldehyd enthielten. Es wurden 0,01 - 0,05 ml einer 2,3 mMolaren Formaldehydlösung zugegeben, was im einzelnen eine Konzentration von 23, 46, 69, 93 und 116 µM Formaldehyd (in 1 ml Endvolumen) der Standards ergab.

Proben, Standards und Leerwerte wurden 10 Minuten lang bei 37° C in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurden zum Reaktionsabbruch 0,5 ml der Inkubationslösung in Reaktionsgefäße überführt, in denen 0,25 ml Zinksulfat (20%ig) und 0,25 ml Bariumhydroxid (gesättigt) vorgelegt waren. Nach gründlicher Durchmischung wurde 10 Minuten zentrifugiert und 0,5 ml des Überstandes mit 0,5 ml einer Mischung von Ammoniumacetat mit Acetylaceton (0,2 ml Acetylaceton ad 100 ml Ammoniumacetat 2 M) versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37° C wurden Proben, Leerwerte und Standards bei 405 nm in einem Beckman-Photometer gegen Aqua bidest. gemessen. Die Auswertung erfolgte an Hand der ermittelten Standard-Eichkurve.

IV. Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der mikrosomalen Proteinfraction wurde eine Flachgelelektrophoreseapparatur (Nr. 146300 der Firma Desaga GmbH, Heidelberg) verwandt. Aufgetrennt wurde in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach LAEMMLI (1970). In 0,0625 M Tris-HCl-Puffer (15% Glycerin, 5% Mercaptoäthanol, 2,3% SDS, pH 6,8) wurde Mikrosomenprotein (Endkonzentration 2 mg/ml) suspendiert und anschließend 3 Minuten gekocht. Zur Vereinfachung des Auftragens auf das Gel und zur Beobachtung der Front wurden 0,05 ml einer 0,1%igen Bromphenolblaulösung zu diesem Gemisch gegeben. 0,01 ml der Mikrosomensuspension (entsprechend 20 µg Protein) wurden dann auf eine 3%iges Polyacrylamid/Bis-Acrylamid-Sammelgel (30 mg/ml Acrylamid + 0,8 mg/ml Bis-Acrylamid) aufgetragen und zunächst bei einer Stromstärke von 25 mA konzentriert, anschließend erfolgte in dem nachgeschalteten 10%igen Polyacrylamid/Bis-Acrylamid-Trenngel (Länge 7-9 cm, 100 mg/ml Acrylamid + 2,7 mg/ml Bis-Acrylamid)

für ca. 2 Std. bei 40 mA die Auftrennung. Während der Laufzeit war die Apparatur auf + 4° C gekühlt, die Temperatur bei der Gelpolymerisation betrug + 18° C. Die Gele wurden in einer Lösung von 25% Isopropanol, 10% Eisessig und 65% Aqua best. mit 0,05% Coomassie-Blue für 3 Stunden gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in einer Lösung aus 10% Isopropanol, 10% Eisessig und 80% Aqua bidest. über 24-36 Stunden. Danach wurden die Gele in 3%ige Glycerin-Lösung überführt und densitometrisch am Gilford Spektrophotometer 2400 untersucht. Der prozentuale Anteil der einzelnen Proteinfractionen am Gesamtprotein wurde durch Auswägen der den densitometrischen Kurvengipfeln zuzuordnenden Flächenanteile des Hämoproteinbereichs ermittelt.

V. Substanzen

Die verwendeten Reagenzien waren von analytischem Reinheitsgrad. Außer den nachfolgend gesondert aufgeführten Substanzen stammten alle Reagenzien von der Firma Merck/Darmstadt. NADP, Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und Actinomycin D wurden von Boehringer Mannheim bezogen. Biphenyl und 2-OH Biphenyl stammten von BDH-Chemicals (Poole, Dorset), 4-OH Biphenyl von Hopkins und Williams Ltd. Metyrapon stellte Ciba Pharmaceutical Co., Div. Ciba Geigy Corp. zur Verfügung. Cycloheximid und die für die Gelelektrophorese benutzten Substanzen stammten von der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg. 3-Methylcholanthren kam von Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y., Äthylmorphin wurde von der Apotheke der Universitätskliniken Mainz bezogen, die verwendeten Gase lieferte Firma Linde (Mainz).

VI. Statistik

Sämtliche Berechnungen wurden auf einem Wang "Serie 700 A" - Rechner nach Programmen des Pharmakologischen Instituts der Universität Mainz durchgeführt. Die Mittelwerte wurden arithmetrisch bestimmt; die Streuungen sind die Standardfehler des Mittelwertes.

ERGEBNISSE

I. Entwicklung des Gesamtkörpergewichtes und des Leberfeuchtgewichtes

Tabelle 2 zeigt die Veränderung des Gesamtkörpergewichtes und des Leberfeuchtgewichtes der Behandlungsgruppen nach Beendigung der 24-stündigen Induktionsperiode. Bei den Kontrolltieren ergab sich sowohl in der NaCl- als auch in der Ölkontrollgruppe eine übereinstimmende Gewichtszunahme von 10 Gramm. Die Gabe von PB führte zu einer geringeren Gewichtszunahme (4 Gramm), 3-MC bewirkte einen Gewichtsstillstand. Die Proteinsyntheseinhibitoren AD und CH führten zu einem Gewichtsstillstand (AD), bzw. zu einer Gewichtsabnahme (CH: 3 Gramm). Dieser Effekt wurde durch Kombination mit PB oder 3-MC verstärkt, so daß entweder ein Gewichtsstillstand (AD + PB) resultierte, oder es zu einer ausgeprägten Gewichtsabnahme kam (CH + PB: 6 Gramm, AD + MC: 7 Gramm, CH + MC: 8 Gramm). Es ist festzustellen, daß 3-MC zu einer stärkeren Einschränkung der Gewichtszunahme als PB führt und CH, verglichen mit der jeweiligen AD-Gruppe, eine größere Abnahme des Gesamtkörpergewichtes bewirkte. Parallel zur Veränderung des Gesamtkörpergewichtes ist in Tabelle 2 die Entwicklung des Leberfeuchtgewichtes aufgetragen. Generell zeigen alle Behandlungsgruppen bis auf eine Ausnahme (3-MC bei Induktionsbeginn um 10 Uhr) eine gegenüber ihren Kontrollgruppen eher negative Lebergewichtsentwicklung, die zwischen 0,4 und 2,2 Gramm liegt. Besonders AD führt zu einer konstanten Lebergewichtsabnahme zwischen 2,0 und 2,2 Gramm je Tier, wobei diese Abnahme unabhängig von der Kombination mit einem Induktor ist. CH hingegen bewirkt alleine keine Lebergewichtsabnahme. Bei einem Vergleich der Leberfeuchtgewichtsveränderung

Tabelle 2: Veränderung des Gesamtkörpergewichtes und des Leberfeuchtgewichtes von unterschiedlich vorbehandelten Ratten in 24 Stunden.

Vorbehandlung	N	Tiergewichtsveränderung in 24 Stunden [Gramm]	Lebergewicht [g/150 g Tier]
Ø1	9	+ 10	8,9 + 0,84
MC ¹	7	+ 0	8,7 + 0,82
AD + MC ¹	11	- 7	6,9 + 0,97
MC ²	8	+ 1	9,3 + 0,64
AD + MC ²	14	- 5	6,7 + 1,03
CH + MC	10	- 6	8,1 + 2,0
NaCl	9	+ 10	9,2 + 1,3
PB	10	+ 4	8,3 + 1,25
AD + PB	8	+ 0	7,2 + 0,64
CH + PB	10	- 6	8,1 + 2,1
AD	8	+ 0	6,7 + 0,56
CH	9	- 3	8,7 + 1,1

¹Induktionsbeginn: 20 Uhr

²Induktionsbeginn: 10 Uhr

mit der Gesamttiergewichtsveränderung zeigt sich eine Dissoziation der beiden Parameter innerhalb der AD- und CH-Gruppen. AD alleine bzw. AD + PB führen zu einem Gewichtsstillstand am Gesamttier, während andererseits das Leberfeuchtgewicht um 20% des Ausgangsgewichtes gesenkt wird. Spiegelbildlich verschoben sind die Verhältnisse bei CH. CH und CH + PB bewirken am Gesamttier eine Gewichtsabnahme, während das Lebergewicht nur geringfügig verändert wird. Auf Grund dieses Befundes kann man AD im Vergleich zu CH, hinsichtlich des Effektes auf das Gewicht, als die stärkere hepatotrope Substanz ansehen.

II. Toxizität und Letalität

Innerhalb der 24-stündigen Induktionsperiode zeigte sich in den Behandlungsgruppen die folgende toxische Symptomatik.

Alle mit AD behandelten Tiere wiesen nach 12 Stunden Diarrhoe, gesträubtes Fell sowie eine verminderte Spontanmotorik auf; CH-behandelte Tiere zeigten nach 15-18 Stunden die gleichen Erscheinungsbilder. Tiere, die CH + PB erhielten, waren nach 18 Stunden sehr stark sediert, wobei der Seiten- und Rückendrehreflex abgeschwächt oder aufgehoben war. Mit PB allein behandelte Tiere waren dagegen nach 18 Stunden nur leicht sediert und zeigten keine Seitenlage.

Von 56 Tieren, die AD nach dem beschriebenen Dosierungsschema erhielten, starben 15, d.h. insgesamt 27%. Die höchste Letalität ergab sich in der Gruppe AD + PB mit 33%, die niedrigste mit 20% bei alleiniger Applikation von AD. In allen anderen Gruppen starben keine Tiere.

III. Einfluß des Behandlungsbeginnes auf die Bildung von Cytochrom P-448 durch 3-Methylcholanthren in Gegenwart von Cycloheximid und Aktinomycin D

Nachfolgende Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Wurden pro Gruppe 3 unabhängige Mikrosomenpräparationen untersucht, sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwertes wiedergegeben, bei geringerem Stichprobenumfang sind die jeweiligen Einzelwerte aufgetragen.

1. Spektroskopische Untersuchungen

Nach 24-stündiger 3-MC-Induktion stieg der Cytochrom P-450-Gehalt unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes auf $1,45 \pm 0,02$ (Induktionsbeginn 20 Uhr) bzw. $1,45 \pm 0,01$ nMole/mg Protein (Induktionsbeginn 10 Uhr) an. Der Bezugswert ölbehandelter Kontrollen betrug $1,05 \pm 0,02$ nMole/mg Protein. Die zusätzliche Gabe von AD verhinderte den durch 3-MC-Induktion hervorgerufenen Anstieg bei Induktionsbeginn um 10 Uhr ($1,05 \pm 0,05$ nMole/mg), während bei Induktionsbeginn um 20 Uhr AD den Anstieg nicht unterbinden konnte ($1,43 \pm 0,08$ nMole/mg). Betrachtet man die Lage des Absorptionsmaximums des reduzierten CO-Komplexes, so erkennt man nach alleiniger 3-MC-Gabe eine eindeutige Verschiebung auf 448 ± 0 nm gegenüber einem Absorptionsmaximum von $449,8 \pm 0,2$ nm in Kontrollmikrosomen. AD + MC führt bei Induktionsbeginn um 20 Uhr zu einer Verschiebung auf 449 ± 0 nm, bei Versuchsbeginn um 10 Uhr auf $449,5 \pm 0$ nm. Bei CH findet man eine vom Induktionszeitpunkt unabhängige, vollständige Unterdrückung des durch 3-MC bewirkten Anstieges des Cytochrom P-450-Gehaltes (zwischen 0,87 und 1,08 nMole/mg); das Absorptionsmaximum des CO-Komplexes liegt in dieser Gruppe konstant bei 450 nm.

Tabelle 3.

Änderung des Cytochrom P-450- und Cytochrom b_5 -Gehalts, der Lage des Absorptionsmaximums des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes, der K_m für MP, der Aktivität der Biphenyl-Hydroxylasen und der Äthylmorphin-Demethylase sowie des Apocytochrommusters im Hämoproteinbereich in Rattenlebermikrosomen nach Abschluß einer 24-stündigen Vorbehandlung mit 3-MC, AD + MC, AD + MC, CH + MC, AD und CH in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Versuchsbeginnes.

Vorbeh.	Induktionsbeginn	N	Cytochrom P-450 In Mole/mg Protein	λ_{max} [nm]	Cytochrom b_5 In Mole/mg Protein	K_m Metyrapon 1 μ M	Biphenyl-2-Hydroxylase In Mole/mg Protein x min	Biphenyl-4-Hydroxylase In Mole/mg Protein x min	Äthylmorphin-Demethylase In Mole/mg Protein x min	Densitometrische Gelauwertung des Hämoproteinbereiches			
										Band 1 [%]	Band 2 [%]	Band 3 [%]	Band 4 [%]
UI	20 Uhr	3	1,05 $\pm$ 0,02	449,8 $\pm$ 0,17	0,71 $\pm$ 0,04	89 $\pm$ 17	0,11 $\pm$ 0,04	2,37 $\pm$ 0,29	9,2 $\pm$ 0,4	21 $\pm$ 3	33 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1
MC	20 Uhr	3	1,45 $\pm$ 0,02 ⁺⁺	448 $\pm$ 0	0,74 $\pm$ 0,04	277 $\pm$ 49 ⁺	1,30 $\pm$ 0,04 ⁺⁺	4,12 $\pm$ 0,26 ⁺	6,3 $\pm$ 0,4	19 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1 ⁺	22 $\pm$ 1 ⁺⁺	22 $\pm$ 1
AD + MC	20 Uhr	3	1,43 $\pm$ 0,08 ⁺⁺	449 $\pm$ 0	0,64 $\pm$ 0,05	226 $\pm$ 21 ⁺⁺	0,68 $\pm$ 0,05 ⁺⁺	4,15 $\pm$ 0,07 ⁺⁺	8,4 $\pm$ 0,6	21 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1 ⁺	21 $\pm$ 1 ⁺⁺	19 $\pm$ 1
CH + MC	20 Uhr	2	1,08 / 0,87	450/450	0,70 / 0,81	89 / 55	0,12 / 0,20	2,70 / 1,77	11,0 / 6,6	17 / 29	30 / 19	12 / 12	21 / 21
MC	10 Uhr	3	1,45 $\pm$ 0,01 ⁺⁺	448 $\pm$ 0	0,74 $\pm$ 0,03	297 $\pm$ 39 ⁺⁺	1,20 $\pm$ 0,11 ⁺⁺	3,82 $\pm$ 0,33	5,9 $\pm$ 0,3	15 $\pm$ 4	23 $\pm$ 2 ⁺	23 $\pm$ 1 ⁺⁺	24 $\pm$ 2
AD + MC	10 Uhr	3	1,05 $\pm$ 0,05	449,5 $\pm$ 0	0,51 $\pm$ 0,04	89 $\pm$ 23	0,23 $\pm$ 0,03	2,79 $\pm$ 0,16	10,6 $\pm$ 1,0	13 $\pm$ 4	41 $\pm$ 4	12 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1
CH + MC	10 Uhr	1	1,02	450	0,72	65	0,11	2,39	4,6	22	32	11	22
AD	20 Uhr	2	1,10 / 1,18	449,5 / 449,5	0,76 / 0,60	51 / 112	0,10 / 0,10	2,90 / 2,60	9,6 / 10,7	20 / 21	29 / 28	14 / 12	19 / 19
CH	20 Uhr	2	0,86 / 0,86	450/450	0,67 / 0,69	45 / 92	0,04 / 0,05	1,90 / 1,53	7,4 / 5,9	28 / 23	35 / 28	7 / 11	20 / 22
AD	10 Uhr	1	1,30	450	0,64	90	0,06	3,13	11,6	24	50	7	13
CH	10 Uhr	1	0,97	450	0,64	57	0,04	2,10	6,3	33	34	7	15

$\bar{x} \pm s.f.$, ⁺⁺ $p < 0,01$; ⁺ $p < 0,05$ gegenüber Kontrollgruppe (Ö1)

Die Veränderung der apparenten Bindungskonstante für MP zeigt die im Cytochrom P-450-Gehalt angedeutete, vom Induktionszeitpunkt abhängige differentielle Hemmbarkeit der 3-MC-Induktion durch AD deutlicher. Nach 3-MC-Induktion steigt die apparente Bindungskonstante K_S für MP erheblich an, und zwar auf $277 \pm 49 \mu\text{M}$ (Induktionsbeginn 20 Uhr) und $297 \pm 39 \mu\text{M}$ (Induktionsbeginn 10 Uhr), gegenüber einem Ausgangswert von $89 \pm 17 \mu\text{M}$ in ölbehandelten Kontrollen. Die zusätzliche Gabe von AD zeigt, daß bei Induktionsbeginn um 20 Uhr die Senkung der Affinität reduzierter Mikrosomen zu MP nicht verhindert wird ($K_S : 226 \pm 21 \mu\text{M}$), während die Affinität bei Induktionsbeginn um 10 Uhr absinkt ($K_S : 89 \pm 23 \mu\text{M}$). CH dagegen führt unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes zu einer Bindungskonstante, die der von unbehandelten Kontrollmikrosomen entspricht.

Der Cytochrom b_5 -Gehalt ist in allen Gruppen, unabhängig von der Vorbehandlung, unverändert.

Bei alleiniger Vorbehandlung mit AD und CH zeigen der Cytochrom P-450- und der Cytochrom b_5 -Gehalt sowie die apparente Bindungskonstante K_S für MP keine bedeutsamen Veränderungen gegenüber Kontrollmikrosomen.

2. Enzymatische Untersuchungen

Zur weitergehenden Unterscheidung zwischen 3-MC-induzierten Mikrosomen und Kontrollen wurden als enzymatische Parameter die 2- und 4-Hydroxylierung von Biphenyl sowie die Äthylmorphin-Demethylierung herangezogen. Tabelle 3 zeigt, daß der Umsatz von Biphenyl zum Endprodukt 2-OH Biphenyl durch ölkontrollmikrosomen bei $0,11 \pm 0,04 \text{ nMole/mg Protein min.}$ liegt. MC-Induktion führt zu einer Erhöhung der Aktivität auf $1,30 \pm 0,04$

(Induktionsbeginn 20 Uhr), bzw. $1,20 \pm 0,11$ nMole/mg Protein x min. (Induktionsbeginn 10 Uhr), d.h. auf das über 10-fache der Ausgangsaktivität. Die zusätzliche Gabe von AD führt bei Induktionsbeginn um 20 Uhr zu einer Aktivität der 2-Hydroxylase von $0,68 \pm 0,07$ nMole/mg Protein x min., d.h. zu einer Erhöhung auf das 6-fache gegenüber Kontrollmikrosomenaktivität, bei Induktionsbeginn um 10 Uhr jedoch nur auf $0,23 \pm 0,033$ nMole/mg Protein x min. Man findet im großen und ganzen ebenso wie bei den bisher aufgeführten Parametern eine vom Behandlungsbeginn abhängige, unterschiedliche inhibitorische Wirkung von AD auf die Bildung von Cytochrom P-448, nur daß hier nicht wie beim Cytochrom P-450-Gehalt und der K_s die Extremwerte der maximalen Induktion bzw. der Kontrollbehandlung erreicht werden.

CH bewirkt unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes eine vollständige Hemmung der Aktivitätssteigerung der 2-Hydroxylase nach 3-MC Vorbehandlung.

Die 4-Hydroxylierung von Biphenyl durch mikrosomales Protein wurde durch 3-MC-Vorbehandlung von $2,37 \pm 0,29$ nMole/mg Protein x min. in 01-kontrollmikrosomen auf $4,12 \pm 0,26$ nMole/mg Protein x min. (Induktionsbeginn 20 Uhr) und $3,82 \pm 0,23$ nMole/mg Protein x min. (Induktionsbeginn 10 Uhr) angehoben. AD hat bei Induktionsbeginn um 20 Uhr keinen hemmenden Einfluß ($4,15 \pm 0,072$ nMole/mg Protein x min.), während bei Induktionsbeginn um 10 Uhr die Aktivitätssteigerung verhindert wurde ($2,79 \pm 0,16$ nMole/mg Protein x min.). CH bewirkt eine umfassende, vom Induktionszeitpunkt unabhängige Supprimierung der Zunahme der 4-OH Hydroxylaseaktivität.

Die N-Demethylierung von Äthylmorphin ist eine durch PB-Induktion stimulierbare Reaktion (SLADEK und MANNERING, 1969). Sie hat deshalb in

dieser Untersuchungsreihe nur eine beschränkte Aussagekraft. 3-MC-Vorbehandlung führt zu einer Senkung der N-Demethylierung von Äthylmorphin von einem Basiswert von $9,2 \pm 0,35$ nMole/mg Protein x min. in Ölmikrosomen auf $6,3 \pm 0,41$ bzw. $5,9 \pm 0,31$ nMole/mg Protein x min. AD verhindert bei Induktionsbeginn um 10 Uhr diese Senkung der Äthylmorphin-Demethylierungsgeschwindigkeit ($10,6 \pm 1,03$ nMole/mg Protein x min.) deutlicher als bei Induktionsbeginn um 20 Uhr ($8,4 \pm 0,56$ nMole/mg Protein x min.).

Die alleinige Vorbehandlung mit AD führt zu keiner Veränderung der Hydroxylierung von Biphenyl sowie der N-Demethylierung von Äthylmorphin. CH bewirkt eine geringe Verminderung der Hydroxylaseaktivität und eine etwas stärker ausgeprägte Verminderung der N-Demethylierung von Äthylmorphin.

3. Densitometrische Gelauswertung

Aus Tabelle 3 geht außerdem die prozentuale Verteilung des Peptidmusters im Hämoproteinbereich (MG 48000-60000) von Rattenlebermikrosomen nach gelelektrophoretischer Auftrennung hervor.

3-MC verursacht nach 24-stündiger Induktion eine relative Zunahme des Bandes 3 (MG 54000-56000) auf $22\% \pm 1\%$ bzw. $23\% \pm 1\%$ des Gesamthämoproteinbereiches gegenüber $10\% \pm 1\%$ bei Ölkontrollmikrosomen. Diese Verschiebung ist begleitet von einer kompensatorischen Abnahme des Bandes 2 (MG 50000-52000) auf $21\% \pm 1\%$ bzw. $23\% \pm 2\%$ gegenüber $33\% \pm 3\%$ in Ölkontrollen.

Ein dem nach alleiniger 3-MC-Gabe genau entsprechendes Apocytochrommuster findet man bei zusätzlicher Gabe von AD bei Induktionsbeginn um 20 Uhr (Band 3: $21\% \pm 1\%$; Band 2: $23\% \pm 1\%$), während bei Induktionsbeginn

um 10 Uhr das Verteilungsmuster dem von Kontrollmikrosomen entspricht (Band 3: $12\% \pm 1\%$; Band 2: $41\% \pm 4\%$). CH dagegen veranlaßt unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes ein Kontrollmuster. Band 1 (MG 48000-50000) und Band 4 (MG 56000-58000) zeigen in allen Gruppen keine deutlichen Veränderungen. Dasselbe gilt für den gesamten Hämoproteinbereich, wenn AD oder CH alleine gegeben werden.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Beeinflussung der Induktion mit 3-Methylcholanthren

3-MC führt innerhalb der 24-stündigen Induktionsperiode, unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes, zu den in der Literatur beschriebenen charakteristischen Veränderungen der spektroskopischen und enzymatischen Eigenschaften von Cytochrom P-450. Im einzelnen findet man eine Erhöhung des Cytochrom P-450-Gehaltes um etwa 40%, eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um 2 nm zum kürzeren Wellenbereich, eine starke Affinitätsabnahme gegenüber MP, wie die entsprechenden apparenten Bindungskonstanten K_s belegen, sowie eine um ca. das 10-fache erhöhte Umsatzrate von Biphenyl zu 2-OH Biphenyl. Das gelelektrophoretische Bandenmuster des Hämoproteinbereiches wird zur Bande 3 hin verschoben, d.h. zu einer Bande mit höherem Molekulargewicht. Eine relative Zunahme der Bande 4 konnte nicht festgestellt werden. Die zusätzliche Gabe von AD führt bei Induktionsbeginn um 10 Uhr zur vollständigen Blockierung der Ausbildung dieser charakteristischen 3-MC-Wirkung, während bei Induktionsbeginn um 20 Uhr der Cytochrom P-450-Gehalt, die apparente Bindungskonstante K_s für MP sowie das gelelektrophoretische Apocytochrommuster weiterhin 3-MC-spezifisch sind. Eine gewisse Abweichung bringt die 2-Hydroxylierung von

Biphenyl, die nur auf das 6-fache der Ausgangsaktivität erhöht ist, während man nach reiner 3-MC Induktion eine 10-fach erhöhte Aktivität vorfindet. CH zeigt diese vom Induktionszeitpunkt abhängige Verhalten nicht, sondern bewirkt jeweils eine vollständige Hemmung der 3-MC-Wirkung. Werden die Proteinsyntheseinhibitoren AD und MC alleine gegeben, so zeigt sich innerhalb von 24 Stunden keine bedeutsame Veränderung der P-450-Eigenschaften gegenüber denen von Kontrollmikrosomen.

IV. Einfluß des Behandlungsbeginnes auf die Induktion von Cytochrom P-450 durch Phenobarbital in Gegenwart von Cycloheximid und Aktinomycin D

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt; da jeweils weniger als 3 unabhängige Mikrosomenpräparationen untersucht wurden, sind die jeweiligen Einzelwerte wiedergegeben.

1. Spektroskopische Untersuchungen

PB bewirkt nach 2-maliger Applikation von 80 mg/kg innerhalb von 24 Stunden eine Erhöhung des Cytochrom P-450-Gehaltes um durchschnittlich 50% (auf 1,35/1,58 nMole Cytochrom P-450/mg Protein gegenüber 0,91/1,0 nMole Cytochrom P-450/mg Protein in NaCl-Kontrollmikrosomen). Dieser Anstieg läßt sich unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes durch AD und CH unterbinden. Die Gabe von CH führt darüberhinaus zu einem Cytochrom P-450-Gehalt, der etwas unter dem von Kontrollmikrosomen liegt. Das Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes liegt in allen Gruppen bei 450 nm, der Cytochrom b_5 -Gehalt ist in allen Untersuchungsgruppen etwa konstant.

Tabelle 4.

Änderung des Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 -Gehalts, der Lage des Absorptionsmaximums des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes, der K_s für MP, der Aktivität der Biphenyl-Hydroxylasen und der Äthylmorphin-Demethylase sowie des Apocytochrommutters im Hämoproteinbereich in Rattenlebermikrosomen nach Abschluß einer 24-stündigen Vorbehandlung mit PB, AD + PB und CH + PB in Abhängigkeit von Zeitpunkt des Versuchsbeginnes.

Vorbeth.	Induktionsbeginn	N	Cytochrom P-450 [in Mole/mg Protein]	λ max [nm]	Cytochrom b_5 [in Mole/mg Protein]	K_s Methylgruppen [μ M]	Biphenyl-2-Hydroxylierung [in Mole/mg Protein $\times$ min]	Biphenyl-4-Hydroxylierung [in Mole/mg Protein $\times$ min]	Äthylmorphin-Demethylierung [in Mole/mg Protein $\times$ min]	Densitometrische Gelaufwertung des Hämoproteinbereiches Band 1 1% Band 2 1% Band 3 1% Band 4 1%	
NaCl	20 Uhr	2	1,0 / 0,91	450/450	0,73 / 0,62	60 / 76	0,15 / 0,09	2,70 / 1,83	8,4 / 7,7	20 / 21 34 / 35 10 / 9	19 / 19
PB	20 Uhr	2	1,35 / 1,58	450/450	0,74 / 0,74	13 / 9	0,23 / 0,21	4,0 / 3,65	13 / 17,5	16 / 10 50 / 51 7 / 8	17 / 17
AD + PB	20 Uhr	2	1,02 / 0,97	450/450	0,76 / 0,69	85 / 86	0,15 / 0,14	2,67 / 2,00	5,5 / 7,8	31 / 27 23 / 30 12 / 10	17 / 18
CH + PB	20 Uhr	2	0,77 / 0,66	449,5 / 449,5	0,74 / 0,62	59 / 40	0,04 / 0,08	2,20 / 0,77	5,0 / 2,3	27 / 32 25 / 19 9 / 12	21 / 21
NaCl	10 Uhr	1	0,94	450	0,61	81	0,07	2,40	8,6	17 48 7	16
PB	10 Uhr	1	1,43	450	0,74	12	0,19	3,60	16,9	15 57 6	12
AD + PB	10 Uhr	1	1,00	450	0,58	72	0,11	2,10	6,9	27 37 9	15
CH + PB	10 Uhr	1	0,77	450	0,70	48	0,03	1,59	4,7	27 34 10	18

Die Affinität von Cytochrom P-450 für MP wird durch PB-Vorbehandlung stark gesteigert, wie die entsprechende apparente Bindungskonstante K_s zeigt (K_s für PB-Mikrosomen: 9,0/13,0 μM gegenüber 60/81 μM in Kontrollen). Diese Affinitätszunahme wurde durch AD und CH, unabhängig vom Induktionsbeginn, aufgehoben.

2. Enzymatische Untersuchungen

PB führt zu einer Erhöhung der Aktivität der 4-Hydroxylase von Biphenyl (3,6/4,0 nMole/mg Protein x min. gegenüber 1,8/2,7 nMole/mg Protein x min. von NaCl-Kontrollen) und der N-Demethylierung von Äthylmorphin (von 7,7/8,6 nMole/mg Protein x min. in NaCl-Kontrollen auf 13/17,5 nMole/mg Protein x min. nach PB-Induktion). Diese Aktivitätssteigerungen sind durch AD unabhängig vom Induktionsbeginn zu unterbinden. CH führt zu einem über die Induktionsblockierung hinausgehenden Effekt. Die 4-Hydroxylierung von Biphenyl liegt in dieser Gruppe unter der Aktivität von Kontrollmikrosomen (0,77/2,20 nMole 4-OH Biphenyl/mg Protein x min.), die N-Demethylierung wird auf etwa 50% (2,3/5,0 nMole/mg Protein x min.) der Kontrollmikrosomenaktivität gesenkt. Diese Senkung liegt deutlich unter dem Effekt, der durch CH alleine hervorgerufen wird (siehe Tabelle 3).

Die 2-Hydroxylierung von Biphenyl wird, wie CREAVEN und PARKE (1966) zeigten, durch PB praktisch nicht induziert. Dies zeigt sich auch in den vorliegenden Ergebnissen, wo man in allen Gruppen übereinstimmend nur einen sehr geringen Umsatz vorfindet.

3. Densitometrische Gelauswertung

Das Apocytochrommuster im Hämoproteinbereich (MG 48000-60000) wird durch PB-Induktion zu Band 2 (MG 50000-52000) hin verschoben (Zunahme um 14% auf 50% des Gesamthämoproteinstusters). Kompensatorisch nimmt der relative Anteil der Banden 1,3 und 4 gleichmäßig ab. AD und CH kombiniert mit PB verhindert nicht nur diese Verschiebung zu Band 2 vollständig, sondern führen darüber hinaus zu einer geringfügigen Abnahme von Band 2. Diese Abnahme wird durch Erhöhung des Anteiles von Band 1 (MG 48000-50000) am Apocytochrommuster voll kompensiert. Der relative Anteil der Banden 3 und 4 am Apocytochrommuster bleibt bei allen Gruppen unverändert.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Beeinflussung der Induktion mit Phenobarbital

PB führt bei zweimaliger Applikation von 80 mg/kg innerhalb von 24 Stunden zu einer Vermehrung des Cytochrom P-450-Gehaltes um durchschnittlich 50%, zu einer deutlichen Affinitätssteigerung des gebildeten Cytochromes gegenüber MP, sowie annähernd zu einer Verdoppelung der 4-Hydroxylase- und der Äthylmorphin-Demethylaseaktivität. Das Apocytochrommuster des Hämoproteinbereiches wird zu Band 2 (MG 50000-52000) hin verschoben. Diese für PB-Einwirkung typischen Veränderungen des mikrosomalen Proteins sind durch AD unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes aufhebbar, im Gegensatz zu der Wirkung von AD bei 3-MC-Induktion. CH führt daneben zu einer über die reine Blockierung der PB-Wirkung hinausgehenden Abnahme des Cytochrom P-450-Gehaltes, sowie der 4-Hydroxylase- und der Äthylmorphin-Demethylaseaktivität. Diese Veränderung kann durch die alleinige Gabe von CH (siehe Tabelle 3) nicht erreicht werden.

AD und CH kombiniert mit PB führen gleichermaßen zu einem Apocytochrommuster des Hämoproteinbereiches, das weder dem PB-induzierter noch dem von Kontrollmikrosomen entspricht. Vielmehr findet man eine Zunahme der niedermolekularen Bande 1 (MG 48000-50000) um durchschnittlich 10%, die durch eine Abnahme der Bande 2 kompensiert wird.

DISKUSSION

Aktinomycin ist ein Inhibitor der Transkription in der Pro- und Eukaryontenzelle. Das sehr toxische Antibiotikum, das aus einem aus Aminosäuren und N-Methylaminosäuren aufgebauten Peptidteil und einem planaren Chromophor besteht, wird von verschiedenen Streptomycesarten produziert (s. Übersicht: GOLDBERG und FRIEDMAN, 1971). AD intercaliert mit seinem Chromophor zwischen zwei Basenpaaren der DNA-Doppelhelix, und zwar in der Nachbarschaft eines Guanosin-Cytosin-Paares, während an Adenin und Thymin keine Bindung erfolgt (s. Übersicht: REICH und GOLDBERG, 1964). Hierdurch wird die RNA-Polymerase inhibiert. Die Ablösung der m-RNA-Kette von der DNA ist nicht mehr möglich, wodurch die Synthese aller zellulären RNA-Fractionen, besonders aber die der r-RNA, unterdrückt wird (s. Übersicht: GOLDBERG und FRIEDMAN, 1971). Die mitochondriale RNA-Synthese wird dagegen nicht beeinflusst. In höheren Konzentrationen hemmt AD durch Inhibierung der DNA-Polymerase auch die Replikation. Die Stärke der Intercalierung des AD in die DNA-Doppelhelix ist von der Aminosäurezusammensetzung des Peptidanteiles abhängig. An Einzelstrang-DNA wird AD nur schwach gebunden (HASELKORN, 1964).

Cycloheximid, ein Glutarimidderivat, das in Streptomyces griseus gebildet wird, ist ein Inhibitor der Translation in der Eukaryontenzelle. Es inhibiert den Peptidkettenstart sowie das Peptidkettenwachstum durch Angriff an der 70 S Untereinheit der r-RNA (SISLER und SIEGEL, 1967). Cycloheximid verhindert hierbei die Anlagerung von Aminoacetyl-t-RNA sowie die Translokation der t-RNA von der Akzeptor- zur Donatorstelle (Peptidylstelle), sowie die Loslösung der t-RNA von der Donatorseite (McKEEHAN und HARDESTY, 1969; KORNER, 1966). Die Hemmung der Translo-

kation ist durch Inhibierung der Translokase II bedingt (BALIGA et al., 1969).

In vorliegender Arbeit wurde die Hemmbarkeit der MC- und PB-Induktion durch AD und CH in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt des Induktionsbeginns untersucht. In der MC-Gruppe zeigt sich, daß AD innerhalb einer 24-stündigen Induktionsperiode bei Versuchsbeginn um 10 Uhr die Ausbildung von Cytochrom P-448 vollständig unterdrückt. Dies steht in Obereinstimmung mit den Ergebnissen von GELBOIN und BLACKBURN (1964), und ALVARES et al. (1968a). Bei Induktionsbeginn um 20 Uhr zeigt sich dagegen eine weitaus schwächere inhibitorische Wirkung von AD auf die durch MC ausgelöste Bildung von Cytochrom P-448. Der Cytochrom P-448-Gehalt, die Aktivität der 4-Hydroxylase von Biphenyl sowie das gelelektrophoretische Hämoproteinmuster entsprechen den Werten nach reiner MC-Vorbehandlung, während nur bei der 2-Hydroxylase von Biphenyl und der K_s für MP nicht die Extremwerte wie nach alleiniger MC-Behandlung erreicht werden. Das Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes liegt mit 449 nm genau zwischen Cytochrom P-450 und P-448. CH dagegen zeigt dieses vom Induktionszeitpunkt abhängige Verhalten nicht, sondern bewirkt stets eine vollständige Hemmung der MC-Wirkung. Es ist demnach zu konstatieren, daß die Hemmbarkeit der Neubildung von Cytochrom P-448 durch den RNA-Syntheseinhibitor AD einen circadianen Rhythmus aufweist.

Zahlreiche Funktionen der Rattenleber unterliegen einem Tagesrhythmus. Es treten endogen gesteuerte Schwankungen im DNA- und RNA-Gehalt sowie tageszeitliche Abweichungen der mikrosomalen Enzymaktivitäten auf.

Der RNA+DNA-Metabolismus zeigt hierbei folgende circadiane Rhythmen:

1. Die RNA-Polymerase I, das Enzym, das für die Synthese der r-RNA verantwortlich ist, weist ein Aktivitätsmaximum zwischen 1 und 11 Uhr und ein Aktivitätsminimum zwischen 17 und 20 Uhr auf (GLASSER und SPELSBERG, 1972). Bei der RNA-Polymerase II lag in der gleichen Studie das Aktivitätsmaximum zwischen 24 und 5 Uhr, gefolgt von einer minimalen Aktivität um 10 Uhr. Dagegen fanden NEUBERT und RAUTENBERG (1976) unter vergleichbaren Bedingungen ein Aktivitätsmaximum um 9 Uhr und ein Aktivitätsminimum um 18 Uhr. Die RNA-Polymerase II synthetisiert eine der DNA ähnliche RNA-Fraktion, ist im Nucleoplasma lokalisiert und durch α -Amanitin hemmbar (ROEDER und RUTTER, 1969).
2. Der r-RNA-Gehalt der Leberzelle zeigt eine tageszeitliche Rhythmik mit einem Maximum in den frühen Abendstunden (BARNUM et al., 1958), bzw. zwischen 15 und 21 Uhr (DÖRING und RENSING, 1973). Im Thymus (Maximum: 23 Uhr) und im Myokard (Maximum: 17 Uhr) sind ebenso solche Zyklen zu finden, nicht aber in der Milz (MISUROVA et al., 1977). DIEMINGER (1973) fand einen erhöhten Gehalt an freien Ribosomen in den frühen Morgenstunden in der Rattenleberzelle, während die membran-gebundene Ribosomenfraktion über 24 Stunden konstant blieb.
3. Für die DNA wurde von einigen Autoren ein zur r-RNA inverses Verhalten gefunden. Sowohl in der Rattenleberzelle (RUBEY et al., 1973) als auch im Zwerchfell der Maus (REBOLLEDO und GAGLIARDINO, 1971) findet man maximale DNA-Konzentrationen etwa um 12 Uhr, während das Minimum in den Nachtstunden zwischen 0 und 4 Uhr liegt. Der vormittags erhöhten DNA-Konzentration folgt eine um etwa 4 Stunden verschobene erhöhte Mitoserate (BARNUM et al., 1958; SCHULTE-HERMANN, 1976).

Die tagesrhythmischen Verschiebungen der RNA-Polymerase-Aktivität sowie des DNA- und RNA-Gehalts gehen einher mit synchronen Verschiebungen in der Konzentration von chromosomalem Nicht-Histon-Protein (GAUB, 1976). Morphologisch sind circadiane Cyclen in der Leberzelle ebenfalls nachweisbar. Bei der elektronenmikroskopischen Darstellung findet man in den Nachtstunden im zentralen und mittleren Bereich der Leberzelle erhöhte Konzentrationen des glatten endoplasmatischen Retikulums, während das rauhe endoplasmatische Retikulum keine tagesrhythmischen Schwankungen zeigt (CHEDID und NAIR, 1972). In der Mäuseleberzelle konnte gezeigt werden, daß das Kernvolumen, aber auch das Zellplasma/Kern-Verhältnis um 3 Uhr nachts am größten ist, bei minimalen Werten um 15 Uhr nachmittags (AGENOSOVA, 1974).

Ausgelöst werden die circadianen Rhythmen im Nucleinsäurestoffwechsel

- a) durch die Beleuchtungsverhältnisse;
- b) durch das Freßverhalten der Ratte, die auch bei Futterangebot ad libitum hauptsächlich nachts frißt;
- c) durch tageszeitliche Veränderungen des Plasmagluccorticoidspiegels.

LINDELL et al. (1977) zeigten, daß die tageszeitlichen Aktivitätsverschiebungen der RNA-Polymerase I durch konstante Beleuchtung aufzuheben sind. NEUBERT und RAUTENBERG (1976) nehmen dagegen an, daß der Anstieg der RNA-Polymerase weitgehend unabhängig von der Belichtung bald nach Beginn der Fütterungsperiode einsetzt. Werden Ratten invers zu ihrer natürlichen Nahrungsaufnahme, d.h. in den Morgenstunden gefüttert, so folgt dieser Nahrungsaufnahme ein rascher Anstieg der RNA-Synthese (WHITTLE und POTTER, 1968) sowie der RNA-Polymerase-Aktivität (BARBIROLI et al., 1973). Die nachfolgende Futterkarenz in den Nachtstunden kann aber einen Wiederanstieg beider Parameter in der

Nacht nicht unterdrücken, so daß eine Steuerung des circadianen RNA-Cyclus durch die Lichtverhältnisse nicht ausgeschlossen werden kann. Steroide bewirken eine Steigerung der Produktion von verschiedenen RNA-Fraktionen, so der r-RNA (GREENMAN et al., 1965), einer spezifischen m-RNA (ROSENFELD et al., 1972) und der t-RNA (WICKS et al., 1965). Die in vitro-Synthese von RNA durch zelluläres Chromatin zeigt einen klaren circadianen Rhythmus mit einer maximalen Syntheserate um 23 Uhr (STEINHART, 1971) bzw. 0,30 Uhr (EARP, 1974). Dieser Rhythmus ist in adrenalectomierten Tieren weitgehend aufgehoben, kann aber durch die Gabe einer physiologischen Dosis Hydrocortison um 16,30 Uhr wiederhergestellt werden (EARP, 1974). EARP (1974) folgerte aus diesen Untersuchungen, daß die tagesrhythmischen Veränderungen im Glucocorticoidspiegel eine Steuerung der Genomaktivität bedingen und hierdurch die circadianen Rhythmen des RNA-Gehaltes weitgehend zu erklären sind.

Neben den tagesrhythmischen Konzentrationsänderungen von DNA und RNA findet man Veränderungen mikrosomaler Enzymaktivitäten in der Leberzelle. Dies gilt z.B. für die Hexobarbitaloxydase, die p-Nitroanisol-O-Demethylase (RADZIALOWSKI und BOUSQUET, 1968; JORI et al., 1971; HOLCSLAW et al., 1975), die Aminopyrin-N-Demethylase (RADZIALOWSKI und BOUSQUET, 1968) und die Anilin- und Biphenyl-4-Hydroxylase (LAKE et al., 1976). Die Biphenyl-2-Hydroxylase zeigt dagegen keine deutlichen tageszeitlichen Schwankungen (LAKE et al., 1976). Bei allen Enzymen zeigen sich Aktivitätsmaxima in der Nacht und Aktivitätsminima am Tag zwischen 14 und 18 Uhr. Diese Aktivitätsverschiebungen verschwinden bei kontinuierlicher Beleuchtung (HOLCSLAW et al., 1975), ebenso sind sie in blinden Ratten (NAIR et al., 1970) und adrenalectomierten Tieren nicht vorhanden (RADZIALOWSKI und BOUSQUET, 1968). Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 zeigen

keine tagesrhythmischen Konzentrationsänderungen (COLAS et al., 1969; LAKE et al., 1976), so daß der Wechsel der mikrosomalen Enzymaktivitäten hierauf nicht zurückgeführt werden kann. Es zeigt sich aber eine unterschiedliche Bindung von exogenen Substanzen an mikrosomales Hämoprotein (LAKE et al., 1976) mit einem Bindungsmaximum in den Nachtstunden und dem Bindungsminimum um 16 Uhr. Zum Zeitpunkt der niedrigsten mikrosomalen Enzymaktivität findet man in der Ratte die höchsten Plasmacortisolspiegel (RADZIALOWSKI und BOUQUET, 1968; LAKE et al., 1976). Corticosteroide sind Substrate und Inhibitoren des mikrosomalen Enzymsystems (KUNTZMAN et al., 1964; TEPHLY und MANNERING, 1968), so daß zu der verminderten Bindung von exogenen Substraten und der herabgesetzten mikrosomalen Enzymaktivität gegenüber Fremdstoffen am Ende der Beleuchtungsperiode eine vermehrte Besetzung von mikrosomalen Bindungsstellen durch Cortisol bei Verdrängung des exogenen Substrates beitragen könnte (LAKE et al., 1976).

Die Rattenleberzelle zeigt somit einen hauptsächlich endogen gesteuerten Cyclus mit einem maximalen RNA-Gehalt sowie erhöhten mikrosomalen Enzymaktivitäten in den Nachtstunden. Zur Frage einer Modulation dieses Tagesrhythmus durch Enzyminduktoren liegen bisher nur wenige Befunde vor, die zu unterschiedlichen Interpretationen führen. Durch die 4-tägige Gabe von PB werden die tagesrhythmischen Veränderungen des Arzneistoffwechsels zum Verschwinden gebracht (RADZIALOWSKI und BOUSQUET, 1968). BUSHNELL und JETER (1978) fanden nach 5-wöchiger Fütterung von Ratten mit 2-Acetylaminofluoren (AAF) eine Abnahme des gesamten Leberproteins sowie des RNA-Gehaltes der Leberzelle. In dieser Studie ließen sich weder in der Kontroll- noch der AAF-Gruppe statistisch signifikante circadiane Schwankungen im RNA und DNA-Gehalt nachweisen. Allerdings wird durch AAF die 4-6 Stunden nach Futteraufnahme zu beobachtende

erhöhte Einbaurrate von ^{14}C -Orotsäure in RNA unterbunden. Durch Hexachlorcyclohexan werden die normalen circadianen Schwankungen der DNA-Synthese sowie der Mitoserate in der Rattenleberzelle deutlich verstärkt (SCHULTE-HERMANN, 1976). Mit MC als Induktor sind derartige Untersuchungen bisher allerdings noch nicht durchgeführt worden.

Zur Erklärung unseres Befundes einer circadianen Schwankung der AD-Wirkung auf die Cytochrom P-448-Neusynthese nach MC lassen sich zwei Hypothesen bilden:

1. In den Abendstunden kommt es nicht zu einer effektiven Hemmung der RNA-Synthese durch AD; das Versagen von AD bei der Cytochrom P-448-Synthese ist nur eine Folge dieser ausbleibenden Hemmung der RNA-Synthese
2. Wird jedoch die RNA-Synthese durch AD auch in den Abendstunden effektiv blockiert, so muß man folgern, daß die Neusynthese von Cytochrom P-448 nicht auf die Neusynthese einer induktionsspezifischen RNA-Spezies angewiesen ist, zumindest nicht am Abend.

Untersuchungen, die sich mit tageszeitlichen Schwankungen der Hemmwirkung von AD auf die RNA-Synthese befassen, sind uns nicht bekannt. Es ist allerdings gezeigt worden, daß die Bindungskapazität des gesamten zellulären Chromatins sowie der gesamten nucleären DNA für AD um 15 Uhr gegenüber den Werten um 9 Uhr auf das Doppelte erhöht ist (BARBIROLI et al., 1973a). Zu dem Zeitpunkt, an dem diese Autoren die größte AD-Aufnahmefähigkeit finden, beschreibt SCHULTE-HERMANN (1976) in der Leber die größte Mitoserate. Damit stehen in den Abendstunden für AD, das seine inhibitorische Wirkung durch Intercalierung mit der DNA entfaltet, mehr Bindungsmöglichkeiten zur Verfügung. Bei gleichbleibender vorgegebener AD-Menge werden deshalb möglicherweise in den

Abendstunden nicht alle DNA-Sequenzen besetzt werden, so daß der Prozeß der Proteinsynthese partiell fortbestehen könnte. So fanden DEGUCHI und AXELROD (1972), daß der abendliche Anstieg der Serotonin-N-Acetyltransferase in der Glandula pinealis der Ratte durch Gabe von 1 mg/kg AD kurz vor Beginn der Dunkelperiode nicht zu inhibieren ist, während ROMERO et al. (1975) unter vergleichbaren Versuchsbedingungen eine fast vollständige Blockierung des Enzymanstieges durch 5 mg/kg AD nachweisen konnten. Obwohl bei dieser hohen AD-Dosis toxische oder unspezifische Wirkungen des Antibiotikums nicht auszuschließen sind, legen diese Ergebnisse den Schluß nahe, daß AD für eine ausreichende Inhibierung in den Abendstunden relativ hoch dosiert werden muß.

Einige Untersuchungen, die sich mit Veränderungen der tageszeitlichen Cyclen von hepatischen Enzymaktivitäten durch Proteinsyntheseinhibitoren befassen, liegen vor. So wird die circadiane Rhythmik der Argininosuccinatsynthetase (ASS) durch AD nicht beeinflusst (KATO et al., 1978). BERNDT et al. (1972) fanden, daß der abendliche Anstieg der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Co A Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) durch AD nicht unterbunden wird, während die morgendliche Aktivitätsabnahme des Enzymes nach AD-Gabe verzögert ist. Nach CH-Gabe findet man dagegen, daß die circadianen Rhythmen der HMG-CoA-Reduktase (SHAPIRO und RODWELL, 1969) sowie der ASS (KATO et al., 1978) in der Rattenleberzelle verschwinden. Der nächtliche Anstieg der Serotonin N-Acetyltransferase in der Glandula pinealis der Ratte wird durch CH ebenfalls inhibiert (DEGUCHI und AXELROD, 1972).

Diese Befunde mit CH sichern, daß der abendliche Anstieg der genannten Enzymaktivitäten von einer de novo-Proteinsynthese abhängig ist. Der fehlende Einfluß von AD auf die Tagesrhythmik muß nicht unbedingt allein

durch eine unzureichende Dosierung des Inhibitors zur Hemmung der RNA-Synthese bedingt sein, sondern könnte bedeuten, daß der abendliche Anstieg der Enzymaktivitäten unabhängig von einer de novo-RNA-Synthese, d.h. transkriptionsunabhängig, erfolgt. Somit würde sich der kritische Prozeß bei der Tagesrhythmik auf die Ebene der Translation verlagern. Das Problem der AD-Wirkung auf tagesrhythmische Vorgänge weist damit eine gewisse Parallelität zu unserer Frage nach einer tageszeitlich unterschiedlichen Wirkung von AD auf die Induktion von Cytochrom P-448 durch MC auf.

Eine initiale Neusynthese von - als induktionsspezifisch geduteter - RNA wurde in Zellkulturen als für die Cytochrom P-448-Synthese essen- tiell gezeigt. In Hamsterzellkulturen wird der durch Benzpyren-Induktion ausgelöste Anstieg der AHH durch die synchrone Gabe von AD oder CH mit dem Induktor inhibiert (NEBERT und GELBOIN, 1970). Wird AD aller- dings erst nach erfolgter Präinkubation mit Benzpyren dem Kulturmedium zugesetzt, findet sich innerhalb der ersten 4 Stunden keine Inhibierung des weiteren AHH-Anstieges, während CH eine weitere Aktivitätszunahme vollständig blockiert. Dieser Effekt ist bereits nach relativ kurzer Präinkubationszeit (30 Minuten) nachweisbar (NEBERT und BAUSSERMAN, 1970). Erfolgt eine Vorinkubation der Zellkulturen mit Benzpyren bei gleichzeitiger Gabe von CH, bleibt die AHH-Aktivität unverändert niedrig. Wird dieses Inkubationsmedium jedoch durch AD oder Kontroll- medium ersetzt, findet man einen starken AHH-Anstieg (NEBERT und GELBOIN, 1970). NEBERT und GELBOIN (1970) interpretierten ihre Ergeb- nisse dahin, daß es in der ersten Phase der Induktion mikrosomaler Enzymaktivitäten zur Ausbildung einer induktionsspezifischen RNA kommt, wobei diese Phase auch bei Blockierung der Translation

fortbesteht. Die zweite Phase der Induktion erfolgt auf Translations-ebene, wobei diese Phase gegenüber AD insensibel und damit transkriptionsunabhängig ist. Eine ähnliche initiale Abhängigkeit von einer de novo-RNA-Synthese ist auch für die Induktion anderer Enzyme bekannt. Ratten, die 3 Tage lang unter Nahrungskarenz gehalten wurden, zeigen 2 Stunden nach Gabe einer kohlenhydratreichen Nahrung einen maximalen RNA-Gehalt in der Leber sowie eine starke Zunahme der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD)- und Pyruvatkinase (PK)-Aktivität. Wird AD 4 Stunden nach Nahrungsbeginn appliziert, kann der Anstieg der G-6-PD nicht mehr inhibiert werden, während bei AD-Gabe zum Zeitpunkt des Fütterungsbeginnes eine inhibitorische Wirkung auf die G-6-PD-Zunahme beobachtet wird. CH dagegen inhibiert jeweils vollständig den Aktivitätsanstieg der G-6-PD nach Futteraufnahme (SASSOON et al., 1973). Es gibt allerdings auch Situationen, in denen eine Neusynthese von RNA für den Induktionsprozeß nicht erforderlich ist. Eine circadiane differentielle inhibitorische Wirkung von AD konnten ähnlich wie bei den hier vorliegenden Ergebnissen ROMERO et al. (1975) nach Induktion der Serotonin-N-Acetyltransferase durch Isoproterenol in der Glandula pinealis der Ratte zeigen. Die Aktivität der Serotonin-N-Acetyltransferase in der Zirbeldrüse wird sehr leicht durch Lichtverhältnisse beeinflusst (AXELROD, 1974), wobei Veränderungen der Beleuchtungsbedingungen über postganglionäre sympathische Fasern auf die Glandula pinealis übertragen werden. In der Nacht kommt es zu einer gesteigerten Freisetzung von Noradrenalin (BROWNSTEIN und AXELROD, 1974), wodurch die Aktivität der Serotonin-N-Acetyltransferase auf das 50-100-fache ansteigt. Eine kurzfristige Beleuchtung während der Nachtphase führt bereits nach 5 Minuten zu einem starken Abfall der Enzymaktivität

(DEGUCHI und AXELROD, 1972). Die Serotonin-N-Acetyltransferase ist durch Isoproterenol induzierbar. Die Induktion ist bei Tieren, die 16 Stunden unter kontinuierlicher Beleuchtung gehalten wurden, sowohl durch AD als auch CH blockierbar, während die schnelle Reinduktion der Enzymaktivität in der Nachtauch durch hohe Dosen AD (5 mg/kg) nicht ausgeschaltet werden kann. CH inhibiert dagegen vollständig die Reinduktion des Enzymanstieges auch in der Nacht (ROMERO et al., 1975). ROMERO et al. (1975) interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, daß die Induktion der Serotonin-N-Acetyltransferase in der Nachtdurch die Beeinflussung von post-transkriptionalen Prozessen erfolgt, während für die Induktion am Tage eine Einwirkung auf transkriptionale Prozesse, d.h. eine erhöhte RNA-Synthese, nötig ist. Damit zeigt sich eine Parallelität mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen über die unterschiedliche Wirksamkeit von AD auf die durch MC ausgelöste Bildung von Cytochrom P-448 in der Leberzelle. Wie die vorliegenden Versuche zeigen, kommt es trotz Gabe des Transkriptionshemmstoffes AD in den Abendstunden zu einer Bildung von Cytochrom P-448 durch MC. Unter der Voraussetzung, daß AD in der verabfolgten Dosierung auch am Abend eine ausreichende Inhibierung der RNA-Synthese bewirkt, ist die Neubildung von Cytochrom P-448 am Abend nicht auf eine de-novo-Synthese einer induktionsspezifischen RNA angewiesen. MC muß demnach seine induktionsspezifischen Wirkungen durch eine Beeinflussung der Translation bewirken. Eine Aktivierung von Initiationsfaktoren der Proteinsynthese auf Translationsebene wurde als MC-Induktionsmechanismus vorgeschlagen (HOPKINSON et al., 1974; BRESNICK et al., 1975). Weiterhin konnten SMITH et al. (1977) keine spezifischen Veränderungen im r-RNA-Metabolismus sowie keine erhöhte Stabilität der 45S-präribosomalen RNA, wie sie nach PB-Induktion typisch sind, nach MC-Gabe

nachweisen. Eine völlige Unabhängigkeit der MC-Induktion von Veränderungen im RNA-Metabolismus ist dennoch nicht zu konstatieren, da AD in unseren Versuchen die MC-Wirkung bei Induktionsbeginn am Morgen völlig inhibiert. In den Abendstunden kommt es zu einer Erhöhung des r-RNA-Gehaltes in der Leberzelle (DÖRING und RENSING, 1973). Man muß daher annehmen, daß diese unspezifische Erhöhung ausreicht, damit MC dann seine induktionsspezifische Wirkung auf posttranskriptionaler Ebene ausüben kann. Gestützt wird die Annahme einer induktionsspezifischen Wirkung von MC auf posttranskriptionale Prozesse dadurch, daß in unserer PB-Gruppe eine vom Induktionszeitpunkt unabhängige Blockierung der PB-Wirkung durch AD vorzufinden ist. PB entfaltet seine induktiven Wirkungen durch Beeinflussung der Transkription, wie SMITH et al. (1972, 1974, 1976) in ausgedehnten Untersuchungen zeigen konnten. Untersuchungen, die eine Veränderung von posttranskriptionalen Prozessen durch PB nachweisen, sind dagegen nicht bekannt. Für die PB-Induktion ist demnach in jedem Fall die Neusynthese einer induktionsspezifischen RNA notwendig, was die Inhibierung der PB-Wirkung durch AD am Abend, im Gegensatz zur MC-Gruppe, erklärlich macht.

In der MC- und PB-Gruppe wurden gleiche AD-Dosierungen benutzt, wobei es durch AD zu einer vollständigen Inhibierung der PB-Induktion am Abend kam. Als ein möglicher Faktor für das Versagen der AD-Wirkung auf die MC-Induktion am Abend wurde eine relative Unterdosierung von AD (s. Hypothese 1) angenommen. Von der vollständigen Inhibition der PB-Induktion am Abend durch AD kann allerdings nicht zurückgeschlossen werden, daß diese Überlegung hinfällig ist. Es konnte nämlich bei einem direkten Vergleich der inhibitorischen Wirkung von AD auf den durch PB und Benzpyren ausgelösten Induktionseffekt in Zellkulturen gezeigt werden, daß AD einen weitaus stärkeren Hemmeffekt auf die

PB-Induktion zeigt als auf die Benzpyren-Wirkung. In Rattenleberzellkulturen findet man, daß die AHH-Aktivitätssteigerung nach PB durch 0,4 nM AD um 30% gehemmt wird, während nach vergleichbarer Benzpyren-Induktion sich eine unter 10% liegende Inhibierungsrate zeigt. 4 nM AD bewirken eine völlige Unterdrückung der PB-Wirkung, wogegen nach Benzpyren die AHH noch 50% derjenigen Maximalaktivität zeigt, die nach alleiniger Induktorgabe vorliegt (NEBERT und GIELEN, 1971).

Zusammenfassend sind die vorliegenden Ergebnisse folgendermaßen zu werten:

1. Die PB-Induktion ist von einer induktionsspezifischen de novo-RNA-Synthese abhängig. Bei Ausschaltung der Transkription durch AD kommt es, unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes, zu einer Inhibierung der PB-Induktion.
2. Das Versagen der AD-Wirkung auf die MC-Induktion bei Versuchsbeginn am Abend wird dahingehend interpretiert, daß MC seine induktionsspezifische Wirkung durch Aktivierung von posttranskriptionalen Prozessen entfaltet. Voraussetzung für die Aktivierung von induktionsspezifischen posttranskriptionalen Prozessen durch MC ist eine initial erhöhte Bereitstellung von unspezifischer RNA. Diese erhöhte Bereitstellung von RNA erfolgt in der Rattenleberzelle am Abend durch die circadianen Konzentrationsverschiebungen im RNA-Gehalt. Am Morgen ist eine MC-induzierte RNA-Neusynthese erforderlich. Eine völlige Unabhängigkeit der MC-Induktion von transkriptionalen Prozessen ist demnach nicht zu belegen, da AD die MC-Wirkung bei Versuchsbeginn am Morgen völlig inhibiert. Unabhängig von diesen Vorstellungen kann das Versagen der AD-Inhibition am Abend allerdings auch dadurch bedingt sein, daß AD für eine ausreichende Inhibierung der RNA-Synthese am Abend höher als am Morgen dosiert werden muß.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach 24-stündiger Vorbehandlung der Versuchstiere mit 3-Methylcholanthren (MC) zeigt sich eine Erhöhung des Cytochrom P-450-Gehaltes um etwa 40%, eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes um 2 nm zum Kurzwelligen sowie eine starke Verminderung der Affinität von reduziertem Cytochrom P-450 für den Liganden MP. Der Umsatz des Substrates Biphenyl zu 2-OH-Biphenyl wird auf etwa das 10-fache, zu 4-OH-Biphenyl auf das Doppelte erhöht. Das gelelektrophoretische Bandenmuster wird zur Bande 3 (MG 54000-56000) hin verschoben. Bei der Ausbildung dieser für Cytochrom P-448 typischen Parameter zeigen sich keine vom Zeitpunkt des Induktionsbeginnes abhängigen Unterschiede.
2. Durch die synchrone Gabe von Actinomycin D (AD) mit MC wird die Neusynthese von Cytochrom P-448 (gemessen mit den unter 1. aufgeführten Parametern) bei Induktionsbeginn um 10 Uhr vollständig inhibiert. Bei Induktionsbeginn um 20 Uhr zeigt sich dagegen eine weitaus schwächere inhibitorische Wirkung von AD auf die durch MC ausgelöste Bildung von Cytochrom P-448. Der Cytochrom P-448-Gehalt, die Aktivität der 4-Hydroxylase von Biphenyl sowie das gelelektrophoretische Hämoproteinmuster entsprechen den Werten nach reiner MC-Vorbehandlung, zeigen also keinerlei Hemmeffekt; lediglich bei der 2-Hydroxylase von Biphenyl und der Bindungskonstante für MP werden nicht die Extremwerte wie nach alleiniger MC-Behandlung erreicht. Das Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom P-450-Komplexes liegt bei Induktionsbeginn um 20 Uhr bei 449 nm. Cycloheximid (CH) dagegen zeigt dieses vom Induktionszeitpunkt abhängige Verhalten nicht, sondern bewirkt jeweils eine vollständige Hemmung der MC-Induktion.

3. Die zweimalige Gabe von 80 mg/kg Phenobarbital (PB) innerhalb von 24 Stunden führt zu einer Vermehrung des Cytochrom P-450-Gehaltes um durchschnittlich 50%, zu einer deutlichen Affinitätssenkung von reduziertem mikrosomalen Protein gegenüber MP sowie zu einer annähernden Verdoppelung der Aktivität der 4-Hydroxylase von Biphenyl und der Demethylierung von Äthylmorphin. Das gelelektrophoretische Bandenmuster des Hämoproteinbereiches wird zur Bande 2 (MG 50000-52000) hin verschoben. Diese Veränderungen sind sowohl durch CH- als auch durch AD-Gabe aufhebbar, und zwar unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginns.

4. Diese Ergebnisse werden folgendermaßen erklärt:

a) Die Neusynthese der Cytochrome P-450 bei PB- und MC-Induktion ist von einer de-novo-Proteinsynthese abhängig.

b) Das Versagen der AD-Wirkung auf die MC-Induktion bei Versuchsbeginn am Abend kann darauf zurückgehen, daß MC seine induktionsspezifische Wirkung durch Aktivierung von posttranskriptionalen Prozessen entfaltet. Voraussetzung für die Aktivierung von induktionsspezifischen posttranskriptionalen Prozessen durch MC ist eine initial erhöhte Bereitstellung von -nicht induktionsspezifischen- RNA-Fractionen. Diese erhöhte Bereitstellung von RNA erfolgt in der Rattenleberzelle am Abend durch die circadianen Konzentrationsverschiebungen im RNA-Gehalt. Am Morgen ist die MC-Induktion von einer RNA-Neusynthese abhängig, da hier AD die MC-Wirkung völlig inhibiert. Eine völlige Unabhängigkeit der MC-Induktion von transkriptionalen Prozessen ist somit nicht zu belegen. Unabhängig von diesen Vorstellungen kann das Versagen der AD-Inhibition am Abend allerdings auch dadurch bedingt sein, daß AD für eine ausreichende Inhibierung der RNA-Synthese am Abend höher als am Morgen dosiert werden muß.

- c) Die PB-Induktion ist dagegen immer von einer induktionsspezifischen de novo-RNA-Synthese abhängig. Bei Ausschaltung der Transkription durch AD kommt es, unabhängig vom Zeitpunkt des Induktionsbeginns, zu einer Inhibierung der PB-Induktion.

LITERATURVERZEICHNIS

- AGENOSOVA, A.P.: Effect of physical exertion on the diurnal rhythm of the nucleo-cytoplasmic ratios and hepatocyte nuclear volumes in some mammals.
Experimental Biology (Translation from Byulleten Éksperimental'noi Biologii i Meditsiny) 77, 80 (1974)
- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., LEVIN, W., and KUNTZMAN, R.: Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 521 (1967)
- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., and KUNTZMAN, R.: Difference in the kinetic of benzpyrene hydroxylation by hepatic drug metabolizing enzymes from phenobarbital and 3-methylcholanthrene treated rats.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 588 (1968)
- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., LEVIN, W. and KUNTZMAN, R.: Alteration of the microsomal hemoprotein by 3-methylcholanthrene: Effects ethionine and actinomycin D.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 163, 417 (1968a)
- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., LEVIN, W., and KUNTZMAN, R.: Inability of substrates to alter the carbon monoxide and the ethyl isocyanide difference spectra of microsomal hemoprotein.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 176, 1 (1971)
- ALVARES, A.P., and Siekevitz, P.: Gel electrophoresis of partially purified cytochromes P-450 from liver mircosomes of variously treated rats.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 923 (1973)

- ARCOS, J.C., CONNEY, A.H., and BUU-HOI, N.P.: Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes.
J. Biol. Chem. 236, 1291 (1961)
- ARGYRIS, T.S.: Liver growth associated with the induction of aminopyrine demethylase activity after phenobarbital treatment in adult male rats.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 164, 405 (1968)
- ARGYRIS, T.S., and HEINEMANN, R.: Ribosome accumulation in 3-methylcholanthrene induced liver growth in adult male rats.
Exp. Mol. Pathol. 22, 335 (1975)
- ATLAS, S.A., BOOBIS, A.R., FELTON, J.S., THORGEIRSSON, S.S., and NEBERT, D.W.: Ontogenetic expression of polycyclic aromatic compound-inducible monooxygenase activities and forms of cytochrome P-450 in rabbit.
J. Biol. Chem. 252, 4712 (1977)
- AUTOR, A.P., KOSCHNITZ, R.M., HEIDEMA, J.K., and COON, M.J.:
Sedimentation and other properties of the reconstituted liver microsomal mixed-function oxidase system containing cytochrome P-450, reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase, and phosphatidylcholine.
Mol. Pharmacol. 9, 93 (1973)
- AXELROD, J.: The enzymatic conversion of codeine to morphine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 115, 259 (1955)
- AXELROD, J.: The pineal gland: A neurochemical transducer.
Science 184, 1341 (1974)
- BALIGA, B.S., PRONCZUK, A.W., and MUNRO, H.N.: Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver.
J. Biol. Chem. 244, 4480 (1969)

- BARBIROLI, B., MORUZZI, M.S., MONTE, M.G., and TADOLINI, B.: Diurnal rhythmicity of mammalian DNA-dependent RNA polymerase activities I and II: Dependence on food intake.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 62 (1973)
- BARBIROLI, B., MONTI, M.G., TADOLINI, B., and MORUZZI, M.S.: Regulation of RNA synthesis in the liver of rats maintained under controlled feeding schedules.
FEBS-Letters 37, 159 (1973a)
- BARNUM, C.P., JARDETZKY, C.D., and HALLBERG, F.: Time relations among metabolic and morphologic 24-hour changes in mouse liver.
A. J. Physiol. 195, 301 (1958)
- BASU, T.K., DICKERSON, J.W.T., and PARKE, D.V.W.: Effect of development on the activity of microsomal drug metabolizing enzymes in rat liver.
Biochem. J. 124, 19 (1971)
- SEAUFAÏ, H., AMAR-COSTESSEC, A., THINES-SEMPoux, D., WIBO, M., ROBBI, M., and BERTHET, J.: Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver: Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and differential centrifugation in density gradients.
J. Cell. Biol. 61, 213 (1974)
- BERNDT, J., GAUMERT, R., und LÖWEL, M.: Einfluß von Puromycin, Cycloheximid und Actinomycin D auf den tageszeitlichen Rhythmus der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase in der Mäuseleber.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1454 (1972)
- BILLINGS, R.E., and McMAHON, R.E.: Microsomal biphenyl hydroxylation on the formation of 3-hydroxy-biphenyl and biphenyl catechol.
Mol. Pharmacol. 14, 145 (1978)

- BOOBIS, A.R., NEBERT, D.W., and FELTON, J.S.: Comparison of β -naphthoflavone and 3-methylcholanthrene as inducers of hepatic cytochrome P-448 and aryl hydrocarbon hydroxylase activity.
Mol. Pharmacol. 13, 259 (1977)
- BRAWERMANN, G.M., RAVEL, M., SALSER, W., and GROS, F.: Initiation factor requirement for the in vitro synthesis of T₄ lysozyme.
Nature 223, 957 (1969)
- BRESNICK, E.: Ribonucleic acid polymerase activity in liver nuclei from rats pretreated with 3-methylcholanthrene.
Mol. Pharmacol. 2, 406 (1966)
- BRESNICK, E., BRAND, R., KNIGHT, J.A.: Ribonucleic acid biosynthesis in methylcholanthrene treated rats.
Biochem. Biophys. Acta 114, 227 (1966)
- BRESNICK, E., SYNERHOLM, M.E., and TIZARD, G.T.: Changes in liver cytoplasmic RNA after administration of 3-methylcholanthrene.
Mol. Pharmacol. 4, 218 (1968)
- BRESNICK, E. and MOSSÉ H.: Activation of genetic transcription in rat liver chromatin by 3-methylcholanthrene.
Mol. Pharmacol. 5, 219 (1969)
- BRESNICK, E., HOPKINSON, J., and PRICHARD, P.M.: Increased translation as a result of elevated initiation factor activity after administration of 3-methylcholanthrene.
Advanc. Exp. Med. Biol. 58, 151 (1975)
- BRODIE, B.B., and AXELROD, J.: The fate of acetanilide in man.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 94, 29 (1948)
- BRODIE, B.B., GILLETTE, J.R., and LADU, B.N.: Enzymatic metabolism of drug and other foreign compounds.
Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958)

BROWN, R.R., MILLER, J.A., and MILLER, E.G.: The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro. J. Biol. Chem. 209, 211 (1954)

BROWNSTEIN, M.J., and AXELROD, J.: Pineal gland: 24 hour rhythm in norepinephrine turnover. Science 184, 163 (1974)

BURKE, M.D., and SAUNDERS, J.W.: Biphenyl hydroxylations and spectrally apparent interactions with liver microsomes from hamsters pretreated with phenobarbitone and 3-methylcholanthrene. Xenobiotica 5, 357 (1975)

BUSHNELL, D.E., and JETER, J.R.: Effects of 2-acetylaminofluorene on diurnal oscillations in nucleic acid metabolism in two classes of nuclei isolated from rat liver. Canc. Res. 38, 2533 (1978)

CHEDIA, A., and NAIR, V.: Diurnal rhythm in endoplasmic reticulum of rat liver: Electron microscopic study. Science 175, 176 (1972)

CHAN, Y.P.M., SENDECKI, W., and NICHOLLS, D.M.: Effect of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on the binding of aminoacyl transfer RNA in rat liver. Canc. Res. 37, 4220 (1977)

COHEN, A.M., and RUDDON: The metabolism of ribonucleic acid in rat liver after phenobarbital administration. Mol. Pharmacol. 6, 540 (1970)

COLE, A., BRIDGES, J., and NAIR, V.: Daily rhythms in the hydroxylation of 3-hydroxyandrost-5-en-17-one by rat liver microsomes. Endocrinology 84, 165 (1969)

- COMAI, K., and Gaylor, J.L.: Existence and separation of three forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes.
J. Biol. Chem. 248, 4947 (1973)
- CONNEY, A.H., MILLER, E.C., and MILLER, J.A.: The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene.
Canc. Res. 16, 450 (1956)
- CONNEY, A.H., MILLER, E.C., and MILLER, J.A.: Substrate induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver.
J. Biol. Chem. 228, 753 (1957)
- CONNEY, A.H., GILLETTE, J.R., INSCOE, J.K., TRAMS, E.G., and POSNER, H.S.: 3,4-benzpyrene induced synthesis of liver microsomal enzymes which metabolize foreign compounds.
Science 130, 1478 (1959)
- CONNEY, A.H., DAVISON, C., GASTEL, R., and BURNS, J.J.: Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 130, 1 (1960)
- CONNEY, A.H., MICHAELSON, J.A., and BURNS, J.J.: Stimulatory effect of chlorcyclizine on barbiturate metabolism.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 132, 202 (1961)
- CONNEY, A.H., and GILMAN, A.G.: Puromycin inhibition of enzyme inductions by 3-methylcholanthrene and phenobarbital.
J. Biol. Chem. 238, 3682 (1963)
- CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.
Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967)

CONNEY, A.H., LEVIN, W., JACOBSON, M., KUNTZMAN, R., COOPER, D.Y., and ROSENTHAL, O.: Inhibitory effect of carbon monoxide on the hydroxylation of testosterone by rat liver microsomes.
J. Biol. Chem. 243, 3912 (1968)

CREAVEN, P.J., PARKE, D.V., WILLIAMS, R.T.: A fluorimetric study of the hydroxylation of biphenyl in vitro by liver preparations of various species.
Biochem. J. 96, 879 (1965)

CREAVEN, P.J., and PARKE, D.V.: The stimulation of hydroxylation by carcinogenic and non-carcinogenic compounds.
Biochem. Pharmacol. 15, 7 (1966)

DEGUCHI, T., and AXELROD, J.: Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the β -adrenergic receptor.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2547 (1972)

DIAMOND, L., and GELBOIN, H.V.: Alpha-naphthoflavone: An inhibitor of hydrocarbon cytotoxicity and microsomal hydroxylase.
Science 166, 1023 (1969)

DICKINS, M., BRIDGES, J.W., ELCOMBE, C.R., and NETTER, K.J.: A novel haemoprotein induced by isosafrole pretreatment in the rat.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 89 (1978)

DIEMINGER, L.: Freie und membrangebundene Ribosomen in der Rattenleber: Tagesthrythmik und hormonale Einflüsse.
Z. Naturforschung 28, 66 (1973)

DÖRING, R., and RENSING, L.: Circadian rhythm of different RNA fractions in rat liver and the effect of cycloheximide.
Comp. Biochem. Physiol. B 45, 285 (1973)

- EARP, H.S.: Glucocorticoid regulation of transcription: The role of physiologic concentrations of adrenal glucocorticoids in the diurnal variation of rat liver chromatin template availability. *Biochim. biophys. Acta* 340, 95 (1974)
- GALINSKY, T.: Untersuchung zur präferentiellen Hemmung der Biphenyl-Hydroxilierung in Rattenlebermikrosomen. *Med. Diss. Mainz* (1976)
- GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archs. Biochem. Biophys.* 77, 493 (1958)
- GAUB, J.: Diurnal variations in endogenous RNA polymerase activity and amounts of nuclear non-histone-protein DNA and cytoplasmic protein in rat liver. *Histochemistry* 49, 113 (1976)
- GELBOIN, H.V., and SOKOLOFF, L.: The effect of methylcholanthrene and phenobarbital on amino acid incorporation into protein. *Science* 134, 611 (1961)
- GELBOIN, H.V., and BLACKBURN, N.: The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues: Inhibition by actinomycin D and puromycin. *Canc. Res.* 24, 356 (1964)
- GELBOIN, H.V.: A microsome-dependent binding of benzo(a)pyrene to DNA. *Canc. Res.* 29, 1272 (1969)
- GIELEN, J.E., GOUJON, F.M., and NEBERT, D.W.: Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. II Simple Mendelian expression in mouse tissues in vivo. *J. Biol. Chem.* 247, 125 (1972)

- GILLETE, J.R., BRODIE, B.B., and LA DU, B.N.: The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 119, 532 (1957)
- GLASSER, S.T., and SPELSBERG, T.C.: Mammalian RNA polymerase I and II: Independent diurnal variations in activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 951 (1972)
- GOLDBERG, J.H., and FRIEDMAN, P.A.: Antibiotics and nucleic acids.
Ann. Rev. Biochemistry 40, 775 (1971)
- GOUJON, F.M., NEBERT, D.W., and GIELEN, J.E.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. IV. Interaction of various compounds with different forms of cytochrome P-450 and the effect on benzo(a)pyrene metabolism in vitro.
Mol. Pharmacol. 8, 667 (1972)
- GREENMAN, D.L., WICKS, W.D., and KENNEY, F.T.: Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. II. High molecular weight components.
J. Biol. Chem. 240, 4420 (1965)
- HASELKORN, R.: Actinomycin D as a probe for nucleic acid secondary structure.
Science 143, 682 (1964)
- HAUGEN, D.A., v. HOEVEN, T.A., and COON, M.J.: Purified liver microsomal P-450. Separation and characterization of multiple forms.
J. Biol. Chem. 250, 3367 (1975)
- HAZAN, N., and McCAULY, R.: Effect of phenobarbitone on the nucleocytoplasmic transport of ribonucleic acid in vitro.
Biochem. J. 156, 665 (1976)
- v.d. HOEVEN, T.A., and COON, M.J.: Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes.
J. Biol. Chem. 249, 6302 (1974)

- HEYWOOD, D.M.: Formation of the initiation complex using muscle messenger RNAs.
Nature 225, 696 (1970)
- HILDEBRANDT, A.G., LEIBMAN, K.C., and ESTABROOK, R.W.: Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 477 (1969)
- HOLCSLAW, T.L., MIYA, T.S., and BOUSQUET, W.S.: Circadian rhythm in drug action and drug metabolism in the mouse.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 195, 320 (1975)
- HOPKINSON, J., and ARGYRIS, T.: Changes in ribonucleic acid metabolism associated with 3-methylcholanthrene-induced adult rat liver growth.
Lab. Investigation 29, 342 (1973)
- HOPKINSON, J., PRICHARD, P.M., BRESNICK, E.: Translational control at the level of initiation of protein synthesis. The effect of 3-methylcholanthrene administration on the activity of rat liver IF M₂A, IF M₂B and IF M₃.
Biochim. Biophys. Acta 374, 375 (1974)
- JEFCOATE, C.R.E., and GAYLOR, J.C.: Ligand interactions with hemoprotein P-450. II. Influence of phenobarbital and methylcholanthrene induction processes on P-450 spectra.
Biochemistry 8, 3464 (1969)
- JONDORF, W.R., SIMON, D.C., and AVNIMELECH, M.: The stimulation of amino acid incorporation in a mammalian system with phenobarbital, 3-methylcholanthrene and cycloheximide.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 22, 644 (1966)

- JONEN, H.G., HOTHWOHL, B., KAHL, R., and KAHL, G.F.: Influence of pyridine and some pyridine derivates on spectral properities of reduced microsomes and on microsomal drug metabolizing activity.
Biochem. Pharmacol. 23, 1319 (1974)
- JORI, A., SALLE, E.D., and SANTINI, V.: Daily rhythmic variation and liver drug metabolism in rats.
Biochem. Pharmacol. 20, 2965 (1971)
- KAHL, R., JONEN, H.G., and KAHL, G.F.: Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene administration in vivo and isooctane extraction in vitro on metyrapone binding to reduced cytochrome P-450.
Biochem. Pharmacol. 23, 2305 (1974)
- KAHL, G.F., ZIMMER, B., GALINSKY, T., JONEN, H.G., and KAHL, R.:
Induction of cytochrome P-448 by 3-methylcholanthrene in the rat during inhibition of protein synthesis in vivo.
In: Microsomes and Drug Oxidations. (V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R.W. Estrabrook, A.H. Conney, Ed.)
p. 551, Pergamon Press: Oxford, New York (1977)
- KAHL, R., and WULFF, U.: Induction of rat hepatic epoxide hydratase by dietary antioxidants.
Toxicol. appl. Pharmacol., in press (1979)
- KAMPPFMEYER, H., and KIESE, M.: Einige Eigenschaften der Anilin-hydroxylierenden Enzyme in Mikrosomen.
Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 244, 375 (1963)
- KATO, R., LOEB, L., GELBOIN, H.V.: Microsome-specific stimulation by phenobarbital of amino acid incorporation in vivo.
Biochem. Pharmacol. 11, 235 (1965)

- KATO, R., JONDORF, W.R., LOEB, L.A., BEN, T., and GELBOIN, H.V.:
Studies on the mechanism of drug-induced microsomal enzyme activities. V. Phenobarbital stimulation of endogenous messenger RNA and polyuridylic acid-directed L-(^{14}C)-phenylalanine incorporation. *Mol. Pharmacol.* 2, 171 (1966)
- KATO, H., MITZUTANI-FUNAHASHI, M., SHIOSAKA, S., NAHAGAWA, H.:
Circadian rhythmus of urea formation and arginosuccinate synthetase activity in rat liver.
J. Nutr. 108, 1071 (1978)
- KAWALEK, J.C., and LU, A.Y.H.: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. III. Different catalytic activities of rabbit and rat cytochrome P-448.
Mol. Pharmacol. 11, 201 (1975)
- KAWALEK, J.C., LEVIN, W., RYAN, D., THOMAS, P.E., and LU, A.Y.H.:
Purification of liver microsomal cytochrom P-448 from 3-methyl-cholanthrene treated rabbits.
Mol. Pharmacol. 11, 874 (1975)
- KLINGENBERG, M.: Pigments of rat liver microsomes.
Archs Biochem. Biophys. 75, 376 (1958)
- KORNER, A.: Effect of cycloheximide on protein biosynthesis in rat liver.
Biochem. J. 101, 627 (1966)
- KRAULIS, J., and BIRMINGHAM, M.K.: Hydroxylation sequences in rat adrenal steroids and effects of Su 4885 on C_{18} -oxygenation.
Fed. Proc. 22, 530 (1963)
- KUNTZMAN, R., JACOBSON, M., SCHNEIDMAN, K., and CONNEY, A.H.:
Similarities between oxidative drug-metabolizing enzymes and steroid hydroxylases in liver microsomes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 146, 280 (1964)

- LASMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.
Nature 227, 680 (1970)
- LEE, S.A., TREAGER, J.W., BURKE, M.D., CHAKRABORTY, J., and BRIDGES, J.W.: The circadian variation of hepatic microsomal drug and steroid metabolism in the golden hamster.
Chem. Biol. Interactions 12, 81 (1976)
- LINCOLN, R.D., and SRESNICK, E.: The formation of poly A-containing RNA in rat liver after administration of 3-methylcholanthrene.
Chem. Biol. Interactions 12, 341 (1976)
- LEISMANN, R.C.: Effects of metirapone on liver microsomal drug oxidations.
Mol. Pharmacol. 5, 1 (1969)
- LIDDLE, G.W., ISLAND, D., LANGE, E.M., and HARRIS, A.P.: Alterations of steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11 β -hydroxylation.
J. Clin. Endocr. 18, 906 (1958)
- LINDELL, T.J., ELLINGER, R., WARREN, J.T., SUNDHEIMER, D., and McElroy, A.F.: The effect of acute and chronic treatment on the activity of rat liver deoxyribonucleic acid- dependent ribonucleic acid polymerases.
Mol. Pharmacol. 13, 426 (1977)
- LORRY, C.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- LU, A.Y.H., and COON, M.J.: Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble system from liver microsomes.
J. Biol. Chem. 243, 1331 (1968)

- LU, A.Y.H., JUNK, K.W., and COON, M.J.: Resolution of the cytochrome P-450-containing ω -hydroxylation system of liver microsomes into three components.
J. Biol. Chem. 244, 3714 (1969)
- LU, A.Y.H., KUNTZMAN, R., WEST, S., and CONNEY, A.H.: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrates. I. Determination of substrate specificity by the cytochrome P-450 and P-448 fractions.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 1200 (1971)
- LU, A.Y.H., and WEST, S.B.: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. III. Properties of the reconstituted 3,4-benzpyrene hydroxylase system.
Mol. Pharmacol. 8, 490 (1972)
- LU, A.Y.H., KUNTZMAN, R., WEST, S., JACOBSON, M., and CONNEY, A.: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. II. Role of cytochrome P-450 and P-448 fractions in drug and steroid hydroxylations.
J. Biol. Chem. 247, 1727 (1972)
- McKEEHAN, and HARDESTY, B.: The mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocytes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 625 (1969)
- McPHERSON, F.J., BRIDGES, J.W., PARKE, D.V.: The effects of benzopyrene and safrole on biphenyl 2-hydroxylase and other drug-metabolizing enzymes.
Biochem. J. 154, 773 (1976)
- MISUROVA, E., AHLERS, I., KROPACOVA, K.: Circadian rhythm of RNA and DNA in some organs of fed rats.
Folia Biologica (Praha) 23, 205 (1977)

- MITOMA, C., POSNER, H.S., REITZ, H., and UNDEFRIED, S.: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds.
Archs Biochem. Biophys. 61, 431 (1956)
- MURTY, C.N., VERNEY, E., SIDRANSKY, H.: Studies of initiation factors in protein synthesis of host liver and transplantable hepatoma.
Canc. Res. 34, 410 (1974)
- NAIR, V., CASPER, S., SIEGEL, S., and BAU, D.: Regulation of the diurnal rhythm in hepatic drug metabolism.
Fed. Proc. 29, 2965 (1970)
- NASH, T.: The calorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction.
Biochem. J. 55, 416 (1953)
- NEBERT, D.W., and GELBOIN, H.V.: Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of the induced enzyme.
J. Biol. Chem. 243, 6242 (1968)
- NEBERT, D.W., and BAUSSERMANN, L.L.: Fate of inducer during induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in mammalian cell culture. II. Levels of intracellular polycyclic hydrocarbon during enzyme induction and decay.
Mol. Pharmacol. 6, 304 (1970)
- NEBERT, D.W., and Gelboin, H.V.: The role of ribonucleic acid and protein synthesis in microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell culture.
J. Biol. Chem. 245, 160 (1970)
- NEBERT, D.W.: Changes in aryl hydrocarbon hydroxylase activity and microsomal P-450 during polycyclic hydrocarbon treatment of mammalian cells in culture.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 885 (1969)

- NEBERT, D.W., and GIELEN, J.E.: Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mammalian liver cell culture. Effect of actinomycin D and cycloheximide on induction processes by phenobarbital and polycyclic hydrocarbons.
J. Biol. Chem. 246, 5199 (1971)
- NEBERT, D.W., HEIDEMA, J.K., STROBEL, H.W., and COON, M.J.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. Genetic specificity resides in the fraction containing cytochromes P-448 and P-450.
J. Biol. Chem. 248, 7631 (1973)
- NEUBERT, D., and RAUTENBERG, M.: Circadian fluctuations in the activity of DNA-dependent RNA polymerases I and II in the nuclei isolated from mouse tissues and the significance for pharmacological and toxicological studies on transcription.
Arch. Toxicol. 36, 217 (1976)
- OMURA, T., and SATO, R.: A new cytochrome in liver microsomes.
J. Biol. Chem. 237, 1375 (1962)
- OMURA, T., and SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature.
J. Biol. Chem. 239, 2370 (1964)
- OMURA, T., and SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties
J. Biol. Chem. 239, 2379 (1964a)
- RADZIALOWSKI, F.M., and BOUSQUET, W.F.: Daily rhythmic variation in hepatic drug metabolism in the rat and mouse.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 163, 229 (1968)

- RAIG, R., BESCHORNER, J., and AMMON, R.: Vergleichende In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen zur Bildung von phenolischen Biphenylmetaboliten bei verschiedenen Tierarten.
Arzneim.-Forsch. 26, 2178 (1976)
- RAW, I., and MAHLER, H.R.: Studies of electron transport enzymes.
III. Cytochrome b_5 of pig liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 234, 1867 (1959)
- REBOLLEDO, O.R., and GAGLIARDINO, J.J.: Circadian variations of DNA in mouse diaphragm.
American J. Physiology 221, 1481 (1971)
- REICH, E., and GOLDBERG, J.H.: Actinomycin D and nucleic acid function.
In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.
(J.N. Davidson, W.E. Cohn, Ed.)
Volume 3, p. 183 Academic Press (1964)
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac. 235, 279 (1959)
- REMMER, H., and MERKER, H.J.: Drug induced changes in the liver endoplasmic reticulum: association with drug-metabolizing enzymes.
Science 142, 1657 (1963)
- REMMER, H., SCHENKMAN, J., ESTABROOK, R.W., SASAME, H., GILLETTE, J., COOPER, D.Y., NARASIMHULU, S., and ROSENTHAL, O.: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 2, 187 (1966)
- REMMER, H., ESTABROOK, R.W., SCHENKMAN, J., and GREIM, H.: Reaction of drugs with microsomal hydroxylases: Its influence on drug action.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Exp. Pathol. 259, 98 (1968)

- ROEDER, R.G., and RUTTER, W.J.: Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms.
Nature 224, 234 (1969)
- ROMERO, J.A., ZATZ, M., and AXELROD, H.: Beta-adrenergic stimulation of pineal N-acetyltransferase: Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate stimulates both RNA and protein synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2107 (1975)
- ROSENFELD, G.C., COMSTOCK, J.P., MEANS, A.R., and O'MALLEY, B.W.: Estrogen-induced synthesis of ovalbumin messenger RNA and its translation in a cell-free system.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1695 (1972)
- RUBEY, J.R., SCHEVING, L.E., GRAY, S.B., and WHITE, K.: Circadian rhythm of nuclear DNA in adult rat liver.
Exp. Cell Res. 76, 136 (1973)
- RUBIN, A., TEPHLY, T.R., and MANNERING, G.J.: Kinetics of drug metabolism by hepatic microsomes.
Biochem. Pharmacol. 13, 1007 (1964)
- RYAN, D., LU, A.Y.H., WEST, S., and LEVIN, W.: Multiple forms of cytochrome P-450 in phenobarbital and 3-methylcholanthrene treated rats. Separation and spectral properties.
J. Biol. Chem. 250, 2157 (1975)
- RYAN, D., LU, A.Y.H., KAWALEK, J., WEST, S.B., and LEVIN, W.: Highly purified cytochrome P-448 and P-450 from rat liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 1134 (1975a)
- SASSOON, H.F., DROR, Y., WATSON, J.J., and JOHNSON, B.C.: Dietary regulation of liver glucose-6-phosphate dehydrogenase in the rat: starvation and dietary carbohydrate induction.
J. Nutr. 103, 321 (1973)

- SCHENKMAN, J.B., REMMER, H., and ESTABROOK, R.W.: Spectral studies of drug interaction with microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 3, 113 (1967)
- SCHULTE-HERMANN, R.: Fütterungs-Rhythmen und die circadianen Variationen der Zellproliferation bei pharmakologisch induziertem Leberwachstum.
Arch. Toxicol. 36, 235 (1976)
- SHAPIRO, D.J., and RODWELL, V.W.: Diurnal variation and cholesterol regulation of hepatic HMG-CoA reductase activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 367 (1969)
- SISLER, H.D., and SIEGEL, M.R. in GOTTLIEB, D. and SHOW, R., eds.: Antibiotics, Mechanism of Action.
Vol. I., Springer-Verlag (N.Y.) (1967)
- SLADEK, N.E., and MANNERING, G.J.: Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 668 (1966)
- SLADEK, N.E., and MANNERING, G.J.: Induction of drug metabolism.
I. Differences in the mechanisms by which polycyclic hydrocarbons and phenobarbital produce their inductive effects on microsomal N-demethylating systems.
Mol. Pharmacol. 5, 174 (1969)
- SLADEK, N.E., and MANNERING, G.J.: Induction of drug metabolism.
II. Quantitative differences in the microsomal N-demethylating system stimulated by polycyclic hydrocarbons and by phenobarbital.
Mol. Pharmacol. 5, 186 (1969a)
- SMITH, S.J., HILL, R., GLEESON, R.A., and VESELL, E.S.: Evidence for post-transcriptional stabilisation of ribosomal precursor ribonucleic acid by phenobarbital.
Mol. Pharmacol. 8, 691 (1972)

- SMITH, S.J., JACOB, S.T., LIU, D.K., DUCEMAN, B., and VESELL, E.S.:
Further studies on post-transcriptional stabilisation of ribosomal
precursor ribonucleic acid by phenobarbital.
Mol. Pharmacol. 10, 248 (1974)
- SMITH, S.J., LIU, D.K., LEONHARD, T.B., DUCEMAN, B.W., and VESELL, E.S.:
Phenobarbital-induced increases in methylation of ribosomal
precursor ribonucleic acid.
Mol. Pharmacol. 12, 820 (1976)
- SMITH, S.J., LEONHARD, T.B., DUCEMAN, B.W., and VESELL, E.S.:
Differential effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene
on hepatic ribosomal precursor RNA.
Biochem. Pharmacol. 26, 955 (1977)
- STAEBLI, W., HESS, R., and WIEBEL, R.R.: Correlated morphometric and
biochemical studies on the liver cell.
J. Cell Biol. 42, 92 (1969)
- STEINHART, W.: Diurnal rhythmicity in template activity of mouse liver
chromatin.
Biochim. et Biophys. Acta 228, 301 (1971)
- STRITTMATTER, C.F., and BALL, E.G.: The intracellular distribution of
cytochrome components and of oxidative enzyme activity in rat liver.
J. Cell. Comp. Physiol. 43, 57 (1954)
- STRITTMATTER, C.F.: The interaction of nucleotides with microsomal
cytochrome reductase.
J. Biol. Chem. 233, 748 (1958)
- TEPHLY, T.R., and MANNERING, G.J.: Inhibition of drug metabolism.
V. Inhibition of drug metabolism by steroids.
Mol. Pharmacol. 4, 10 (1968)

THOMAS, P.E., LU, A.Y.H., RYAN, D., WEST, S.B., KAWALEK, J., and LEVIN, W.: Multiple forms of rat liver cytochrome P-450. Immunochemical evidence with antibody against cytochrome P-448.

J. Biol. Chem. 251, 1385 (1976)

THOMAS, P.E., LU, A.Y.H., RYAN, D., WEST, S.B., KAWALEK, J., and LEVIN, W.: Immunochemical evidence for six forms of rat liver cytochrome P-450 obtained using antibodies against purified liver cytochromes P-450 and P-448.

Mol. Pharmacol. 12, 746 (1976a)

WELTON, A.F., and AUST, S.D.: The effect of 3-methylcholanthrene and phenobarbital induction on the structure of the rat liver endoplasmic reticulum.

Biochim. Biophys. Acta 373, 197 (1974)

WELTON, A.F., and AUST, S.D.: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 56, 898 (1974a)

WHITTLE, E.D., and POTTER, R.: Systematic oscillations in the metabolism of orotic acid in the rat adapted to a controlled feeding schedule.

J. Nutr. 95, 238 (1968)

WICKS, W.D., GREENMAN, D.L., and KENNEY, F.T.: Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. I. Transfer ribonucleic acid.

J. Biol. Chem. 240, 4414 (1965)

WIEBKIN, P., FRY, J.R., JONES, C.A., LOWING, R., and BRIDGES, J.W.: The metabolism of biphenyl by isolated viable rat hepatocytes.

Xenobiotica 12, 725 (1976)

- WILLIAMS, C.H.J., and KAMIN, H.: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver.
J. Biol. Chem. 237, 587 (1962)
- WOLD, J.S., and STEELE, W.: Alterations in liver nuclear ribonucleic acid of rats treated with phenobarbital.
Mol. Pharmacol. 8, 681 (1972)
- YOUNGER, L.R., SALOMON, R., WILSON, R.W., PEACOCK, A.C., and GELBOIN, H.V.: Effects of polycyclic hydrocarbons on ribonucleic acid synthesis in rat liver nuclei and hamster embryo cells.
Mol. Pharmacol. 8, 452 (1972)

Lebenslauf

Am 17. Januar 1950 kam ich als Sohn des Betriebselektrikers Heinrich Beil und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Kohlbacher, in Mainz-Weisenau zur Welt.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Friedrich-Ebert-Schule in Mainz-Weisenau, von 1960 bis 1966 die Anne-Frank-Realschule in Mainz.

Nach dem Realschulabschluß begann ich 1966 bei der pharmazeutischen Firma C.H. Boehringer Sohn in Ingelheim eine Lehre als Biologielaborant, die ich 1969 abschloß.

Anschließend ging ich an das Ketteler-Kolleg in Mainz, wo ich 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Das Medizin-Studium nahm ich im Sommersemester 1973 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz auf.

1975 legte ich die ärztliche Vorprüfung, 1976 den ersten und 1978 den zweiten Teil der ärztlichen Hauptprüfung ab.

Zur Zeit befinde ich mich im letzten Teil der klinischen Ausbildung, dem praktischen Jahr, am Brüderkrankenhaus in Trier.

Die Untersuchungen zu vorliegender Doktorarbeit führte ich ab März 1977 am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz durch.

